

APLICAÇÃO DA CULTURA DE TECIDOS NO MELHORAMENTO DE
Capsicum annuum: SUPERAÇÃO DE BARREIRAS PÓS-ZIGÓTICAS,
PRODUÇÃO DE GENÓTIPOS EM LARGA ESCALA E PROTOCOLO
PARA OBTENÇÃO DE HAPLOIDES

RAFAEL WALTER

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
FEVEREIRO – 2019

APLICAÇÃO DA CULTURA DE TECIDOS NO MELHORAMENTO DE
Capsicum annuum: SUPERAÇÃO DE BARREIRAS PÓS-ZIGÓTICAS,
PRODUÇÃO DE GENÓTIPOS EM LARGA ESCALA E PROTOCOLO
PARA OBTENÇÃO DE HAPLOIDES

RAFAEL WALTER

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
como parte das exigências para obtenção do
título de Doutor em Genética e Melhoramento de
Plantas.”

Orientadora: Prof^a. Virginia Silva Carvalho

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
FEVEREIRO – 2019

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pelo autor.

W233

Walter, Rafael.

APLICAÇÃO DA CULTURA DE TECIDOS NO MELHORAMENTO DE *Capsicum annum* : SUPERAÇÃO DE BARREIRAS PÓS-ZIGÓTICAS, PRODUÇÃO DE GENÓTIPOS EM LARGA ESCALA E PROTOCOLO PARA OBTENÇÃO DE HAPLOIDES / Rafael Walter. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2019.

164 f. : il.

Bibliografia: 115 - 142.

Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2019.

Orientadora: Virginia Silva Carvalho.

1. Resgate de embriões. 2. Hibridação incompatível. 3. Membranas permeáveis a gases. 4. Cultura de anteras. 5. Intensidade luminosa. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 631.5233

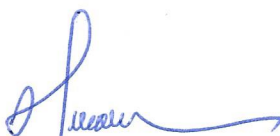
APLICAÇÃO DA CULTURA DE TECIDOS NO MELHORAMENTO DE
Capsicum annuum: SUPERAÇÃO DE BARREIRAS PÓS-ZIGÓTICAS,
PRODUÇÃO DE GENÓTIPOS EM LARGA ESCALA E PROTOCOLO
PARA OBTENÇÃO DE HAPLOIDES

RAFAEL WALTER

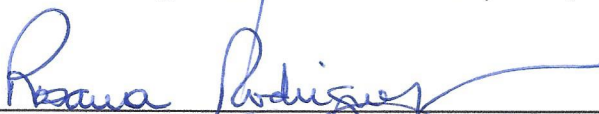
"Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
como parte das exigências para obtenção do
título de Doutor em Genética e Melhoramento de
Plantas."

Aprovada em 26 de fevereiro de 2019.

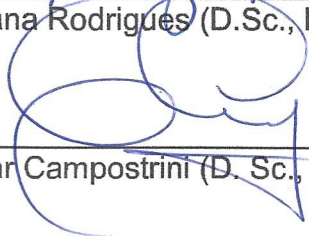
Comissão Examinadora:



Prof. Rodrigo Sobreira Alexandre (D.Sc., Fitotecnia) - UFES



Prof.ª Rosana Rodrigues (D.Sc., Produção Vegetal) - UENF



Prof. Eliemar Campostrini (D. Sc., Produção Vegetal) - UENF



Prof.ª Virginia Silva Carvalho (D.Sc., Fitotecnia) - UENF
(Orientadora)

A todos os professores que se dedicam a transferirem seus conhecimentos ao mundo.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, pela oportunidade de realizar a formação acadêmica que me fez crescer no campo profissional. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) – Código de Financiamento 001, pela bolsa de estudo concedida.

À minha orientadora, professora Virginia Silva Carvalho, que contribuiu significativamente para a minha formação profissional e pessoal, pois acreditou em mim e, por estar sempre disponível, pela troca de experiência e aprendizado, pelo seu bom humor e alegria que contagiava nosso ambiente de trabalho e o torna mais leve e agradável.

À professora Rosana Rodrigues, pelo grande incentivo e apoio neste estudo.

Ao professor Eliemar e aos doutorandos Luciene e Jefferson, pela ajuda nas análises fisiológicas.

Aos meus pais Moacir e Neusa e aos meus irmãos Carlos, Lucas e Maria Vitória que, mesmo longe, sempre torceram pelo meu sucesso e possibilitaram que eu realizasse meus estudos, de que tanto gosto, sempre me incentivando e acreditando no meu crescimento profissional e pessoal.

Aos meus amigos Renan, Andressa e Rodrigo, que participaram e disponibilizaram muitos momentos de diversão e aprendizado, favorecendo o meu amadurecimento e também pelo apoio e por estarem sempre presentes nos momentos mais difíceis, tornando meus dias mais felizes.

Em especial ao meu grande amigo Renan, que me acompanhou durante um período desta caminhada, pelos momentos de descontração e de trabalho, com os quais pude contar sempre em todos os momentos, tornando a saudade mais suportável.

Assim como meu caro amigo Daniel, que contribuiu imensamente para a realização destes trabalhos. E que esteve ao meu lado, compartilhando momentos maravilhosos da minha vida.

Às amizades que conquistei na UENF, Renan, Rodrigo e Otávio, pelos momentos de alegria e descontração.

Aos colegas do laboratório de cultura de tecidos vegetais (LFIT 112), por toda a ajuda, convivência e amizade.

A todos os colegas do laboratório de melhoramento genético vegetal (LMGV 111), por estarem sempre à disposição quando precisei e por toda a ajuda, em especial à Cláudia Pombo e à Cíntia, que não mediram esforços para me auxiliar.

A todos os docentes da pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, pelos ensinamentos.

À minha orientadora da graduação, Maurecilne Lemes da Silva Carvalho, por ser a pessoa que mais me incentivou a fazer o mestrado e me indicou a UENF.

Ao José Daniel Valle de Almeida, funcionário da Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, o meu muito obrigado.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Acessos utilizados como parentais. A) UENF 1623; B) UENF 1632. Silva, 2015.....	13
Figura 2. Número ótimo de clusters genéticos para a análise Bayesiana obtida pelo programa Structure 2.3.4. para cinco genótipos de <i>Capsicum</i>	21
Figura 3. Estimativas da estrutura genética para cinco genótipos de <i>Capsicum</i> por 16 iniciadores microssatélites. Os acessos são representados na linha vertical e cada grupo genético é representado por uma cor.....	21
Figura 4. Dendrograma de dissimilaridade genética entre cinco genótipos de <i>Capsicum</i> , obtido pelo método UPGMA, com base nas variáveis moleculares.....	22
Figura 5. Teste de germinação de sementes <i>Capsicum annuum</i> dos parentais (UENF 1632 e UENF 1623) e híbrido. A) Porcentagem da germinação aos 17 dias (Ger 17d), protrusão da raiz primária (PR) e sementes não germinadas (SNG). B) Índice de Velocidade de Germinação. Colunas seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste Tukey, $P \leq 0,05$	24
Figura 6. Germinação acumulada em B.O.D. de genótipos de <i>Capsicum annuum</i> com irrigação com água ou KNO_3	25

Figura 7. Aspectos morfológicos de sementes de *Capsicum annuum*. Sementes inteiras secas: A) UENF 1623; B) UENF 1632; C-F) Sementes oriundas do cruzamento intraespecífico entre UENF 1632 x UENF 1623 (F₁); Corte longitudinal transmediano: G) UENF 1623; H) UENF 1632; I-N) Híbrido F₁; O-Q) Sementes sem tegumento do híbrido F₁; R-T) Corte transversal do 30híbrido F₁ (R-S) e parental (T). Legenda: EN= endosperma; E= embrião; T= tegumento; R= região hipocótilo-radícula; C= região cotiledonar. Barra: 1mm..... 26

Figura 8. Histologia de sementes de *Capsicum annuum*. A-C) Parentais (UENF 1623 e UENF 1632); D-F) Híbrido F₁ (UENF 1632 x UENF 1623); G-I) Parentais (UENF 1623 e UENF 1632); J-N) Híbrido F₁ (UENF 1632 x UENF 1623); O) Parental 1623 corados com azul de toluidina. Legenda: En: endosperma; Te: tegumento; Co: Cotilédone; Ra: radícula; →: epiderme..... 29

Figura 9. Cortes transversais de diferentes regiões das sementes de *Capsicum annuum*. A) endosperma e tegumento do parental UENF 1623 corado com Lugol; B) endosperma e tegumento do híbrido corado com Lugol; C) tegumento, endosperma e embrião do híbrido, corados com Lugol; D) endosperma do parental UENF 1623 corado com Azul de Coomasie; E) endosperma do híbrido, corados com Azul de Coomasie; F) endosperma parental UENF 1623 corado com Sudan IV; G) Endosperma do híbrido, corado com Sudan IV..... 30

Figura 10. Estádios de excisão e desenvolvimento de embriões de *Capsicum annuum* durante o resgate de embriões *in vitro*. A-C) Remoção do tegumento; D-E) Corte no endosperma; F-G) Pressão no endosperma remanescente e remoção do embrião; H) Embrião em meio de cultura para desenvolvimento no primeiro dia; I) Embrião com 3 dias; J) Embrião com 4 dias; K) Plântula com 7 dias; L) Plântula com 15 dias. Barra = 1 mm..... 32

Figura 11. Germinação *in vitro* de embriões cotiledonares dos parentais (UENF 1623 e UENF 1632) e do híbrido F₁ em meio de cultura. Colunas seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste Tukey, $P \leq 0,05$.. 33

Figura 12. Influência da combinação de fitorreguladores no crescimento <i>in vitro</i> de plântulas do híbrido intraespecífico UENF 1632 x UENF 1623.....	33
Figura 13. Híbrido do cruzamento entre UENF 1632 x UENF 1623. A-B) Aparência geral, cor e fruto do híbrido F ₁ ; C) Sementes do híbrido F ₂ . Bar = 1.0 cm.....	35
Figura 14. Infográfico do esquema fatorial do experimento com diferentes vedações, intensidades luminosas e concentrações de sacarose na germinação e crescimento <i>in vitro</i> de <i>Capsicum annuum</i>	49
Figura 15. Modelo da confecção de membranas microporosas caseiras nas tampas dos frascos de cultivo. A) Membranas M2 com duas camadas de fita microporosa e uma de politetrafluoretileno. B) Vista superior da tampa com membrana caseira. C) Vista inferior da tampa com membrana caseira Adaptado de Saldanha et al., (2012) e Barbosa (2016).....	49
Figura 16. Gráficos das variáveis temperatura (A) e umidade relativa (B) obtidos por meio dos dados coletados na sala de crescimento.....	50
Figura 17. Germinação (%) <i>in vitro</i> de sementes de <i>Capsicum annuum</i> cultivadas <i>in vitro</i> por 45 dias na ausência e com 20 g L ⁻¹ de sacarose. Colunas seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste F (p≤0,05).....	55
Figura 18. Comprimento da parte aérea de plantas de <i>Capsicum annuum</i> germinaram <i>in vitro</i> sobre a influência de: A) Sacarose; B) Intensidade luminosa; C) Tipo de vedação após 45 dias. Colunas seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste ⁽¹⁾ F ou ⁽²⁾ Tukey (p≤0,05).....	56
Figura 19. Aspecto geral de plantas de <i>Capsicum annuum</i> cultivadas <i>in vitro</i> em diferentes concentrações de sacarose, intensidades luminosas e tipo de vedações após 45 dias. Barra= 1cm.....	58
Figura 20. Volume radicular de plantas de <i>Capsicum annuum</i> germinadas e desenvolvidas <i>in vitro</i> em diferentes concentrações de sacarose após 45 dias. Colunas seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste F (p≤0,05).....	59

Figura 21. Aspecto geral das raízes de <i>Capsicum annuum</i> cultivadas <i>in vitro</i> em diferentes concentrações de sacarose, intensidades luminosas e tipo de vedações. Barra= 1cm.....	60
Figura 22. Massa da matéria seca total (MST) de plantas de <i>Capsicum annuum</i> germinadas e desenvolvidas <i>in vitro</i> em diferentes concentrações de sacarose após 45 dias. Colunas seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste F ($p \leq 0,05$).....	70
Figura 23. (A) Relação Fv/Fm e (B) Índice fotossintético de <i>Capsicum annuum</i> cultivados <i>in vitro</i> em diferentes intensidades luminosas após 45 dias. Colunas seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$).....	71
Figura 24. Planta com aspecto hiperídricidade de <i>Capsicum annuum</i> cultivada <i>in vitro</i> por 45 dias com densidade de FFF de $65 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, sem sacarose e vedada com membrana permeável a gases.....	75
Figura 25. Plantas de <i>Capsicum annuum</i> , cultivadas <i>in vitro</i> após 45 dias, apresentando clorose nas folhas. A) $240 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, sem sacarose e vedação com filme PVC; B-C) $240 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 20 g L^{-1} de sacarose e vedação com filme PVC; D) $240 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 20 g L^{-1} de sacarose e vedação com tampa rígida; E-F) $121 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 20 g L^{-1} de sacarose e vedação com tampa rígida. Barra = 1 cm.....	75
Figura 26. Fluxograma do programa de melhoramento genético de <i>Capcicum</i> para ornamentação.....	86
Figura 27. Máxima, média e mínima da temperatura e umidade relativa do ar, entre julho de 2016 a maio de 2017, da casa de vegetação onde foi conduzido o experimento de caracterização da população segregante entre <i>Capsicum annuum</i> var. <i>glabriusculum</i> (UENF 1750) x <i>C. annuum</i> var. <i>annuum</i> (UENF 2030) no município de Campos dos Goytacazes- RJ.....	88
Figura 28. Aspectos morfológicos das classes dos botões florais de <i>Capsicum</i> estabelecidos para determinar o estágio de desenvolvimento do micrósporo em híbridos de pimenta ornamental (UENF 1750 x UENF 2030); A) Classe 1; B) Classe 2; C) Classe 3. (bar= 2mm).....	91

Figura 29. Formato dos frutos da população segregante de pimenta. A) alongado; B) triangular; C) arredondado.....	96
Figura 30. Estádios de maturação dos frutos da população segregante de <i>Capsicum</i> : A e B) cinco estádios de maturação; C) três estádios de maturação. D-G) Coloração da corola da população segregante de <i>Capsicum</i> : D) Branca; E) branca com borda roxa; F) roxa com base branca; G) roxa.....	97
Figura 31. <i>Boxplot</i> dos valores mínimos, máximos e a mediana do peso dos frutos (A), Compimento dos frutos (B), Diâmetro dos frutos (C) e Comprimento do pedúnculo (D) em relação ao formato dos frutos.....	99
Figura 32. Gráfico da função logarítmica da probabilidade (Log-likelihood) em relação ao número de grupos formado para <i>C. annuum</i> var. <i>annuum</i> e <i>C. annuum</i> var. <i>glabriusculum</i> e seus híbridos interespecíficos F ₂	101
Figura 33. Dendrograma UPGMA de 163 acessos de <i>Capsicum annuum</i> utilizando-se a distância de Gower para as variáveis conjuntas (qualitativa + quantitativa). Campos dos Goytacazes, UENF, 2019.....	102
Figura 34. Aspecto geral da diversidade dos formatos e colorações dos frutos de pimenta ornamental da população segregante entre UENF 1750 x UENF 2030.....	105
Figura 35. Aspecto geral da diversidade de flores de pimentas com potencial ornamental da população segregante entre UENF 1750 x UENF 2030.....	106
Figura 36. Relação entre características morfológicas de gemas florais e estágio de desenvolvimento de micrósporos em híbridos de pimenta ornamental (UENF 1750 x UENF 2030) divididos em três classes. A-C) Aspecto do botão floral (bar= 2mm); A) Classe 1; B) Classe 2; C) Classe 3; D-F) Aspecto da antera (bar = 500 µm); D) Classe 1; E) Classe 2; F) Classe 3; G) Célula mãe do microsporo; H-Microsporo em tétrade; I- Microsporo uninucleado (bar = 25 µm).....	108

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Iniciadores microssatélites usados na genotipagem de genótipos de <i>Capsicum</i> . UENF, Campos dos Goytacazes, 2019.....	14
Tabela 2. Resumo da análise de variância com quadrados médios para os efeitos do genótipo (G), tratamento (T) (água e KNO ₃) e sua interação na eficiência da germinação em B.O.D. das sementes dos parentais (UENF 1632 e UENF 1623) e do híbrido F ₁ de <i>Capsicum annuum</i> . Campos dos Goytacazes, 2019.....	23
Tabela 3. Análise biométrica de sementes dos parentais UENF 1623 e UENF 1632 e de seu híbrido F ₁ . Campos dos Goytacazes, 2019.....	26
Tabela 4. Resumo da análise de variância com quadrados médios para os efeitos da Intensidade Luminosa (IL), Sacarose (Sac) e Vedação (Ved) e suas interações na eficiência da germinação e crescimento <i>in vitro</i> de sementes de <i>Capsicum annuum</i> . Campos dos Goytacazes, RJ, 2019.....	54
Tabela 5. Análise de desdobramento do volume radicular de plantas de <i>Capsicum annuum</i> em função da interação entre a concentração de sacarose e o tipo de vedação após 45 dias de cultivo <i>in vitro</i> . Campos dos Goytacazes, 2019.....	61

Tabela 6. Análise de desdobramento do número de folhas de plantas de <i>Capsicum annuum</i> em função da interação entre a Intensidade luminosa e a concentração de sacarose após 45 dias de cultivo <i>in vitro</i> . Campos dos Goytacazes, 2019.....	62
Tabela 7. Análise de desdobramento do número de folhas de plantas de <i>Capsicum annuum</i> em função da interação entre a concentração de sacarose e o tipo de vedação após 45 dias de cultivo <i>in vitro</i> . Campos dos Goytacazes, 2019.....	63
Tabela 8. Análise de desdobramento da área foliar de plantas de <i>Capsicum annuum</i> em função da interação entre a Intensidade luminosa e o tipo de vedação após 45 dias de cultivo <i>in vitro</i> . Campos dos Goytacazes, 2019.....	63
Tabela 9. Análise de desdobramento da área foliar de plantas de <i>Capsicum annuum</i> em função da interação entre a Intensidade luminosa e a concentração de sacarose após 45 dias de cultivo <i>in vitro</i> . Campos dos Goytacazes, 2019.....	64
Tabela 10. Análise de desdobramento da área foliar de plantas de <i>Capsicum annuum</i> em função da interação entre a concentração de sacarose e o tipo de vedação após 45 dias de cultivo <i>in vitro</i> . Campos dos Goytacazes, 2019.....	64
Tabela 11. Massa da matéria seca da parte aérea (MSPA), massa da matéria seca da raiz (MSR) e massa da matéria seca total (MST) de plantas de <i>Capsicum annuum</i> em função da interação entre a Intensidade luminosa e o tipo de vedação após 45 dias de cultivo <i>in vitro</i> . Campos dos Goytacazes, 2019.....	67
Tabela 12. Análise de desdobramento das variáveis de massa da matéria seca da parte aérea (MSPA) e massa da matéria seca da raiz (MSR) de plantas de <i>Capsicum annuum</i> em função da interação entre a concentração de sacarose e o tipo de vedação após 45 dias de cultivo <i>in vitro</i> . Campos dos Goytacazes, 2019.....	68

Tabela 13. Análise de desdobramento da área foliar de plantas de <i>Capsicum annuum</i> em função da interação entre a Intensidade luminosa e a concentração de sacarose após 45 dias de cultivo <i>in vitro</i> . Campos dos Goytacazes, 2019.....	69
Tabela 14. Relação F_v/F_m e índice fotossintético (PI) de plantas de <i>Capsicum annuum</i> em função da interação entre a concentração de sacarose e o tipo de vedação após 45 dias de cultivo <i>in vitro</i> . Campos dos Goytacazes, 2019.....	72
Tabela 15. Análise de desdobramento do índice de SPAD de plantas de <i>Capsicum annuum</i> em função da interação entre a Intensidade luminosa e a concentração de sacarose após 45 dias de cultivo <i>in vitro</i> . Campos dos Goytacazes, 2019.....	74
Tabela 16. Índice de SPAD de plantas de <i>Capsicum annuum</i> em função da interação entre a Intensidade luminosa e o tipo de vedação após 45 dias de cultivo <i>in vitro</i> . Campos dos Goytacazes, 2019.....	74
Tabela 17. Acessos de <i>Capsicum</i> , utilizados para obtenção dos híbridos, com suas respectivas características ornamentais. Fonte: Silva et al. (2017).....	87
Tabela 18. Descrição das classes dos botões florais de <i>Capsicum</i> estabelecidos para determinar o estágio de desenvolvimento do micrósporo Campos dos Goytacazes, 2019.....	90
Tabela 19. Protocolos de cultura de anteras testados nos dois parentais (UENF 1750 e UENF 2030) e oito plantas da geração F_2 do cruzamento entre <i>Capsicum glabriusculum</i> x <i>Capsicum annuum</i>	94
Tabela 20. Composição dos meios de cultura utilizados para indução de plantas haploides a partir da cultura de anteras testados nos dois parentais (UENF 1750 e UENF 2030) e oito plantas da geração F_2 do cruzamento entre <i>Capsicum glabriusculum</i> x <i>Capsicum annuum</i>	95
Tabela 21. Correlações entre as matrizes de dissimilaridade de Mahalanobis, Cole-Rodgerse Algoritmo de Gower obtida por descritores quantitativos e qualitativos em 163 genótipos de <i>Capsicum</i>	99

Tabela 22. Coeficientes de correlação cofenético de diferentes métodos de agrupamento hierárquicos obtidos a partir de descritores qualitativos e quantitativos em 163 genótipos de <i>Capsicum</i>	100
Tabela 23. Resumo da análise variância para a morfologia do botão floral e estágio de desenvolvimento dos micrósporos em híbridos de pimenta ornamental (UENF 1750 x UENF 2030).....	107
Tabela 24. Média da morfologia do botão floral e estágio de desenvolvimento dos micrósporos em híbridos de pimenta ornamental (UENF 1750 x UENF 2030) divididos em três classes.....	108
Tabela 25. Correlação entre as variáveis relacionadas à morfologia do botão floral e ao estágio de desenvolvimento do micrósporo em botões florais de pimentas ornamentais de população segregante entre <i>Capsicum annuum</i> var. <i>glabriusculum</i> (UENF 1750) x <i>C. annuum</i> var. <i>annuum</i> (UENF 2030). Campos dos Goytacazes, 2019.....	111

SUMÁRIO

RESUMO	xvii
ABSTRACT	xix
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
2.1. Geral	4
2.2. Específicos	4
3. CAPÍTULOS	6
3.1. SUPERAÇÃO DE BARREIRAS GENÉTICAS PÓS-ZIGÓTICAS DE HIBRIDAÇÃO EM <i>Capsicum annuum</i> var. <i>annuum</i>	6
3.1.1. INTRODUÇÃO	6
3.1.2. REVISÃO.....	8
3.1.2.1. <i>Capsicum annuum</i> var. <i>annuum</i>	8
3.1.2.2. Melhoramento de <i>Capsicum</i>	10
3.1.2.3. Hibridação e Viabilidade dos Híbridos	10
3.1.2.4. Cultura de embriões <i>in vitro</i>	11
3.1.3. MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
3.1.5. CONCLUSÕES	36
3.2. USO DE DIFERENTES VEDAÇÕES, SACAROSE E IRRADIÂNCIA NO CULTIVO <i>in vitro</i> DE <i>Capsicum annuum</i>	37
3.2.1. INTRODUÇÃO	37

3.2.2. REVISÃO.....	39
3.2.2.1. Cultivo <i>in vitro</i> convencional.....	39
3.2.2.2. Cultivo fotoautotrófico <i>in vitro</i>	40
3.2.2.3. Fonte de carbono	42
3.2.2.4. Intensidade luminosa	43
3.2.2.5. Trocas gasosas e membranas permeáveis a gases	45
3.2.3. MATERIAL E MÉTODOS	47
3.2.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
3.2.5. CONCLUSÕES	77
3.3. EXPLORANDO O POTENCIAL ORNAMENTAL DE UMA POPULAÇÃO SEGREGANTE DE <i>Capsicum</i>	78
3.3.1. INTRODUÇÃO	78
3.3.2. REVISÃO.....	80
3.3.2.1. Importância cultural e econômica	80
3.3.2.2. Pesquisa no Brasil em <i>Capsicum</i> com finalidade ornamental	81
3.3.2.3. Melhoramento de pimentas do gênero <i>Capsicum</i>	83
3.3.2.4. Produção de duplo-haploides	84
3.3.3. MATERIAL E MÉTODOS	85
3.3.3.1. Germoplasma	85
3.3.3.2. Caracterização da população segregante	87
3.3.3.2.1. Condução do experimento.....	87
3.3.3.2.2. Caracterização morfoagronômica.....	89
3.3.3.3. Cultura de anteras	90
3.3.3.3.1. Correlação entre o tamanho do botão floral e o estágio de desenvolvimento do micrósporo	90
3.3.3.3.2. Indução de embriogênese via cultura de anteras	92
3.3.3.3.2.1. Protocolos dos meios para cultura de anteras.....	93
3.3.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	96
3.3.4.1. Caracterização da população segregante	96
3.3.4.2. Produção de duplo-haploides	106
3.3.4.2.1. Correlação entre o tamanho do botão floral e o estágio de desenvolvimento do micrósporo	106
3.3.4.2.2. Indução de embriogênese via cultura de anteras	112
3.3.5. CONCLUSÕES	112

4. CONCLUSÃO GERAL.....	114
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	115

RESUMO

WALTER, Rafael; D. Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Fevereiro 2019; APLICAÇÃO DA CULTURA DE TECIDOS NO MELHORAMENTO DE *Capsicum annuum*: SUPERAÇÃO DE BARREIRAS PÓS-ZIGÓTICAS, PRODUÇÃO DE GENÓTIPOS EM LARGA ESCALA E PROTOCOLO PARA OBTENÇÃO DE HAPLOIDES; Orientadora: Prof^a. Virginia Silva Carvalho; Conselheiros: Prof^a. Rosana Rodrigues e Prof. Geraldo de Amaral Gravina.

Capsicum annuum é a principal espécie do gênero em importância econômica. Embora utilizada principalmente na alimentação, seu potencial ornamental vem sendo explorado nos últimos anos. O presente trabalho teve por objetivo estudar a resposta de *C. annuum* a diferentes técnicas de cultura de tecidos, como o resgate de embriões e a cultura de anteras além de buscar melhorias das condições de cultivo *in vitro*, como aumento das trocas gasosas e intensidades luminosas, bem como verificar a diversidade genética de população segregante de *Capsicum*. No primeiro capítulo, embriões do cruzamento incompatível entre UENF 1632 x UENF 1623 foram inoculados em meio de cultura com diferentes concentrações de sacarose e combinações de fitorreguladores (GA₃, AIA e ZEA) para o resgate dos embriões. Foram realizadas avaliações anatômicas, histológicas e histoquímicas nas sementes do híbrido para verificar as possíveis causas da incompatibilidade. No segundo capítulo, sementes de *C. annuum* foram cultivadas em frascos com diferentes concentrações de sacarose, intensidades luminosas e tipos de vedação dos frascos. Foram realizadas avaliações biométricas e fisiológicas. No terceiro capítulo, foi realizada uma caracterização morfológica para estimar a divergência

genética em uma população segregante entre *C. annuum* var. *glabriusculum* X *C. annuum* var. *annuum*, utilizando o algoritmo de Gower. Com estes mesmos híbridos foram realizadas culturas de anteras. Além disso, foi realizada a correlação entre o botão floral e o estágio de desenvolvimento do micrósporo. No primeiro capítulo, a análise anatômica e os resultados da cultura *in vitro* indicaram que a incompatibilidade intraespecífica entre UENF 1632 e UENF 1623 foi causada pela malformação do endosperma. O resgate de embriões foi eficiente para superar barreiras pós-zigóticas neste cruzamento intraespecífico de *C. annuum*, permitindo a produção de híbridos férteis e o uso da prole em programas de melhoramento. No segundo capítulo, o uso de membranas permeáveis a gases permitiu maior crescimento das plantas, provavelmente aumentando as concentrações de CO₂ no interior dos frascos e diminuindo a umidade. No terceiro capítulo, a análise conjunta das variáveis quantitativas e qualitativas resultou em maior eficiência na determinação da divergência genética entre os acessos avaliados, sendo uma alternativa viável e uma ferramenta importante para o conhecimento da variabilidade em bancos de germoplasma. Na cultura de anteras, não foram obtidas plantas nos meios de cultura testados. No entanto, foi possível verificar uma correlação entre o tamanho do botão floral (cálice e corola do mesmo tamanho) e o estágio uninucleado do microsporo, sendo este o ideal para a coleta visando à produção de plantas haploides. Os resultados obtidos neste trabalho oferecem soluções eficientes para contornar algumas dificuldades frequentemente encontradas em programas de melhoramento genético de *Capsicum*, como a possibilidade de resgate de embriões *in vitro* de cruzamentos incompatíveis, possibilitando a obtenção de novas cultivares. Assim como verificou a existência de uma grande variabilidade em genótipos da população segregante com potencial para a ornamentação. Também definiu as melhores condições para cultivar *in vitro* plantas de *C. annuum*, promovendo maior crescimento e desenvolvimento fisiológico.

Palavras-chave: Resgate de embriões, hibridação incompatível, algoritmo de Gower, Membranas permeáveis a gases, intensidade luminosa, Cultura de anteras.

ABSTRACT

WALTER, Rafael; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; February 2019; APPLICATION OF TISSUE CULTURE IN THE IMPROVEMENT OF *Capsicum annuum*: OVERCOMING POST-ZIGOTIC BARRIERS, PRODUCTION OF GENOTYPES ON LARGE SCALE AND PROTOCOL FOR OBTAINING HAPLOIDES; Advisor: Prof^a. Virginia Silva Carvalho; Committee members: Prof^a. Rosana Rodrigues and Prof. Geraldo de Amaral Gravina.

Capsicum annuum is the main species of the genus in economic importance. Although used primarily in food, its ornamental potential has been explored in recent years. The objective of this work was to study the response of *C. annuum* to different tissue culture techniques, such as embryo rescue and anther culture, as well as to improve *in vitro* culture conditions such as increased gas exchange and light intensities, as well as to verify the genetic diversity of the segregating population of *Capsicum*. In the first chapter, embryos of the incompatible crosses between UENF 1632 and UENF 1623 were inoculated in culture medium with different concentrations of sucrose and combinations of phytohormones (GA₃, IAA and ZEA) for the rescue of the embryos. Anatomical, histological and histochemical evaluations were performed on the hybrid seeds to verify the possible causes of the incompatibility. In the second chapter, seeds of *C. annuum* were cultivated in flasks with different concentrations of sucrose, light intensities and types of bottle cap. Biometric and physiological evaluations were performed. In the third chapter, a morphological characterization was performed to estimate the genetic divergence in a segregating population between *C. annuum* var *glabriusculum* x *C. annuum*

var annuum using the Gower algorithm. Anther cultures were carried out with these same hybrids. The correlation between the floral bud and the stage of development of the microspore was also performed. In the first chapter, anatomical analysis and *in vitro* culture results indicated that the intraspecific incompatibility between UENF 1632 and UENF 1623 was caused by endosperm malformation. Embryo rescue was efficient to overcome post zygotic barriers in this intraspecific cross-breeding of *C. annuum*, allowing the production of fertile hybrids and the use of offspring in breeding programs. In the second chapter, the use of gas-permeable membranes allowed higher plant growth, probably increasing CO₂ concentrations inside the bottles and reducing humidity. In the third chapter, the combined analysis of the quantitative and qualitative variables resulted in greater efficiency in determining the genetic divergence among the evaluated accessions, being a viable alternative and an important tool for the knowledge of variability in germplasm banks. In the anther culture, no plants were obtained in the culture media tested. However, it was possible to verify a correlation between the size of the floral bud (calyx and corolla of the same size) and the uninucleate stage of the microspore, being this the ideal for the collection aiming at the production of haploid plants. The results obtained in this work offer efficient solutions to overcome some difficulties frequently found in genetic improvement programs of *Capsicum*, such as the possibility of *in vitro* embryo rescue from incompatible crosses, allowing the production of new cultivars. As well as verified the existence of a great variability in genotypes of the segregating population with potential for ornamentation. It also defined the best conditions to cultivate *in vitro* plants of *C. annuum*, promoting greater growth and physiological development.

Keywords: Embryo rescue, incompatible hybridization, Gower algorithm, Gas permeable membranes, luminous intensity, Culture of anthers.

1. INTRODUÇÃO

A espécie *C. annuum* compreende duas importantes olerícolas: os pimentões e as pimentas. Os pimentões têm frutos grandes (40 a 150g), não apresentam pungência, são doces, e são consumidos *in natura* na forma de saladas, cozidos ou recheados. As pimentas apresentam frutos pequenos (geralmente menores que 10g), são pungentes e utilizadas como condimento. Todavia, existem cultivares de pimentão de frutos pequenos, assim como mutantes de pimenta não pungentes. A pungência, característica tão importante economicamente e taxonomicamente no gênero *Capsicum*, é resultante da ação da substância capsaicina (8-metil-N-vanilil 1-6-nonamida) (Suzuki e Iwai, 1984).

Além do uso alimentício, o mercado para pimentas ornamentais vem crescendo no Brasil. Os programas de melhoramento genético têm procurado explorar o potencial dos bancos de germoplasma que o Brasil possui. Trabalhos que investigam a diversidade genética são de grande importância, pois é a partir deles que se dá início aos processos de obtenção de novas variedades (Melo et al., 2014; Nascimento et al., 2015; Rêgo et al., 2015; Neitzke et al., 2016).

A regeneração de plantas a partir da cultura de células, tecidos e órgãos *in vitro* é um processo fundamental para a aplicação da biotecnologia vegetal objetivando a propagação e o melhoramento genético de plantas (Loyola-Vargas e Vázquez-Flota, 2006; Davey e Anthony, 2010; Borém e Miranda, 2013; Manzur et al., 2013, 2014; Walter et al., 2018, 2019).

Apesar da importância econômica das pimenteiras, os sistemas de regeneração *in vitro* de espécies de *Capsicum* não evoluíram tão rápido quanto os de algumas outras solanáceas tais como fumo, tomate, batata e petúnia. As espécies de *Capsicum* têm apresentado dificuldades no que diz respeito à regeneração de plantas inteiras a partir de explantes, o que pode ser uma indicação clara de problemas de recalcitrância morfogênica (Fári e Andrásfalvy, 1994; Ochoa-Alejo e Ramírez-Malagón, 2001).

Técnicas de cultivo *in vitro* como o resgate de embriões podem auxiliar os programas de melhoramento genético, pois possibilitam a obtenção de genótipos que não poderiam ser obtidos em cruzamentos incompatíveis. A cultura de embriões consiste em isolar embriões zigóticos, independente da idade, tamanho ou estágio e cultivá-los em meio de cultura para promover seu desenvolvimento (Rappaport, 1954; Yoon et al., 2006; Manzur et al., 2015; Walter et al., 2018, 2019). No entanto, existem poucos relatos do uso desta técnica no gênero *Capsicum* e existem menos ainda, explorando e tentando explicar as causas da incompatibilidade no gênero (Hossain et al., 2003; Yoon et al., 2006; Manzur et al., 2013, 2014, 2015, Walter et al., 2018, 2019).

Alguns fatores pertencentes ao processo convencional da cultura de tecidos podem interferir na morfogênese e assim na resposta *in vitro*, como a intensidade luminosa, o uso de sacarose no meio de cultura como fonte de carbono e a vedação dos frascos (Silva, et al., 2008; Kovalchuk, 2010; Karuppanapandian et al., 2011; Couto, 2012; Taiz e Zeiger, 2013). A utilização de sacarose no meio de cultura fornece energia para o metabolismo vegetal *in vitro*. Plantas do gênero *Capsicum* cultivadas *in vitro* com sacarose têm apresentado maior ganho de biomassa durante a aclimatização (Torres et al., 1998; Hazarika, 2003; Walter, 2015; Walter et al., 2018).

Além da sacarose, a intensidade e a qualidade da luz são fatores importantes para o crescimento e desenvolvimento das plantas *in vitro*. Condições de baixa intensidade de luz nos recipientes de cultivo *in vitro* são análogos às condições de uma planta à sombra. No cultivo *in vitro* convencional geralmente são utilizadas, como fonte de luz, lâmpadas fluorescentes simulando a luz do dia (Macedo et al., 2011).

Outro fator que interfere no cultivo *in vitro* é a vedação do frasco, utilizado para evitar a contaminação do explante, ou seja, a entrada de microrganismos nos

recipientes. Na cultura de tecidos são utilizadas tampas rígidas de polipropileno, filmes de PVC, tampas metálicas, dentre outros materiais. Esta vedação do frasco limita as trocas gasosas com o ambiente, que causam problemas em algumas espécies durante o cultivo *in vitro* e durante a aclimatização. Uma alternativa para aumentar a troca gasosa é o uso de tampas com membranas permeáveis a gases, como algodão e outros materiais (Kozai e Kubota, 2001; Kozai e Nguien, 2003; Nguyen e Kozai, 2005; Lucchesini et al., 2006; Liao et al., 2007; Zhang et al., 2009; Ivanova e Van Staden, 2010; Xiao et al., 2011; Alvarez et al., 2012; Iarema et al., 2012; Saldanha et al., 2012; Batista, 2012; Pinheiro et al., 2013; Barbosa, 2016; Walter et al., 2019).

Outra técnica que auxilia aos programas de melhoramento é a cultura de anteras. Esta técnica consiste no cultivo *in vitro* de anteras com micrósporos no estágio uninucleado. Este estágio de desenvolvimento é o ideal para a conversão da fase gametofítica para a esporofítica. Tendo como objetivo final a obtenção de plantas duplo-haploides (Supena et al., 2006; Irikova et al., 2011).

Além destas características do cultivo *in vitro*, o gênero *Capsicum* é considerado recalcitrante para o cultivo *in vitro*, ou seja, o explante pode não apresentar resposta morfogênica ao cultivo *in vitro* (Fári e Andrásfalvy, 1994; Benson, 2000; Ochoa-Alejo e Ramírez-Malagón, 2001; Kothari et al., 2010).

Diante do exposto, é de extrema importância trabalhos envolvendo o gênero *Capsicum* e as diferentes técnicas de cultura de tecidos, como o resgate de embriões e a cultura de anteras, além de buscar melhorias das condições de cultivo *in vitro*, como aumento das trocas gasosas e intensidades luminosas (Saldanha et al., 2012; Barbosa, 2016; Manzur et al., 2013, 2014, 2015; Alvarez et al., 2012).

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Estudar a resposta de *Capsicum annuum* a diferentes técnicas de cultura de tecidos, como o resgate de embriões e a cultura de anteras além de buscar melhorias das condições de cultivo *in vitro*, como aumento das trocas gasosas e intensidades luminosas, bem como verificar a diversidade genética de população segregante de *Capsicum*.

2.2. Específicos

- i. Usar a caracterização molecular para confirmar os genótipos da espécie *C. annuum* (UENF 1632 e UENF 1623);
- ii. Verificar as possíveis causas da incompatibilidade do cruzamento entre UENF 1632 x UENF 1623;
- iii. Superar a incompatibilidade entre UENF 1632 x UENF 1623 com o resgate de embriões;
- iv. Avaliar a influência de diferentes tipos de vedação dos frascos, intensidades luminosas e concentrações de sacarose no cultivo *in vitro* de *C. annuum*;

- v. Avaliar as taxas fotossintéticas de plantas de *C. annuum* cultivadas em frascos com membrana, em frascos vedados com filme PVC e em frascos com tampa rígida;
- vi. Estimar a divergência genética em uma população segregante entre *Capsicum annuum* var *glabriusculum* X *C. annuum* var *annuum* (UENF 1750 x UENF 2030), com base na análise conjunta das variáveis qualitativas e quantitativas, utilizando o algoritmo de Gower;
- vii. Identificar possíveis marcadores morfológicos relacionando o tamanho do botão floral com o estágio de desenvolvimento do micrósporo para a indução de plantas haploides via cultura de anteras em genótipos de pimenta ornamental do cruzamento entre UENF 1750 x UENF 2030;
- viii. Testar protocolos para indução de plantas haploides a partir da cultura de anteras de genótipos de pimenta ornamental.

3. CAPÍTULOS

3.1. SUPERAÇÃO DE BARREIRAS GENÉTICAS PÓS-ZIGÓTICAS DE HIBRIDAÇÃO EM *Capsicum annuum* var. *annuum*

3.1.1. INTRODUÇÃO

Parte valiosa do patrimônio da biodiversidade do país, as pimentas e pimentões (*Capsicum* L., Solanaceae) estão intimamente relacionados à gastronomia brasileira. Diferentes genótipos comerciais estão disponíveis com vários tipos de frutos, tamanhos, cores, sabores e pungência (Neitzke et al., 2008; Nascimento et al., 2012; Nascimento et al., 2015). Essa diversidade é usada como base para programas de melhoramento genético (Rêgo et al., 2003).

Pimentas são amplamente cultivadas em regiões temperadas e tropicais ao redor do mundo, devido principalmente ao valor do fruto, incluindo altos teores de capsaicina, matéria seca, vitaminas (A, C e complexo B), minerais, óleos essenciais, carotenoides, entre outros aspectos e seus vários usos na culinária, na indústria e na ornamentação (Stommel e Bosland, 2005; Rêgo et al., 2012a, b).

Com base na facilidade de cruzamento entre espécies e fertilidade híbrida, produzindo híbridos férteis, Harlan e De Wet (1971) propuseram os complexos gênicos em *Capsicum*. O cruzamento interespecífico entre espécies de um mesmo

complexo é tido como possível, enquanto o mesmo não acontece para cruzamentos entre espécies de complexos diferentes em que podem ocorrer barreiras pré-zigóticas ou pós-zigóticas. Estes autores classificaram o gênero *Capsicum* em três complexos gênicos: 1) Complexo *C. annuum*: incluindo as espécies *C. annuum* (*C. annuum* L. e *C. glabriusculum* (Dunal) Heiser and Pickersgill), *C. frutescens* L., *C. chinense* Jacq., *C. chacoense* Hunz. e *C. galapagoense* Hunz. (Pickersgill, 1971; Zijlstra et al., 1991); 2) Complexo *C. baccatum*: *C. baccatum* (variedades *baccatum* L. e *pendulum* (Willd.) Eshbaugh), *C. praetermissum* Heiser e PG Sm. (Pickersgill, 1991; Zijlstra et al., 1991) e *C. tovarii* Eshbaugh, PGSm. e Nickrent (Tong e Bosland, 1999); e 3) Complexo *C. pubescens*: *C. cardenasii* Heiser e P.G.Sm., *C. eximium* Hunz e *C. pubescens* Ruiz e Pav. (Pickersgill, 1991; Zijlstra et al., 1991).

Entretanto, trabalhos vêm demonstrando problemas de incompatibilidade na hibridação entre espécies do mesmo complexo gênico (Charlo et al., 2009; Nascimento et al., 2012; Martins et al., 2015) e entre diferentes genótipos da mesma espécie (Silva et al., 2017; Nascimento et al., 2012). Silva et al. (2017) trabalhando com pimentas ornamentais, verificaram uma alta hibridação do cruzamento entre *C. annuum* UENF 1632 x UENF 1623, porém das mais de 800 sementes produzidas, nenhuma germinou.

Marcadores moleculares são ferramentas importantes para complementar à caracterização morfológica dos genótipos e podem auxiliar na correta classificação taxonômica. Além disso, os marcadores moleculares são definidos como elementos capazes de prever, mapear e caracterizar um fenótipo (Guimarães e Moreira, 1999). As tecnologias de análise molecular da variabilidade do DNA permitem determinar pontos de referência nos cromossomos que auxiliam no melhoramento de plantas, pois permitem o acesso direto ao genótipo de um indivíduo. Marcadores moleculares são essenciais para a confirmação das espécies envolvidas em cruzamentos incompatíveis.

A incompatibilidade na hibridação pode ser devida a barreiras pré-zigóticas ou pós-zigóticas. As barreiras pré-zigóticas podem ser causadas pela falta de germinação dos grãos de pólen ou pelo retardamento ou inibição do crescimento do tubo polínico. As barreiras pós-zigóticas podem resultar na morte do embrião, devido à degeneração do endosperma ou inviabilidade do embrião, ou levar à esterilidade total ou parcial das plantas híbridas (Prestes e Goulart, 1995; Monteiro et al., 2011). Em suas pesquisas Pickersgill (1997) afirma que em *Capsicum* após

a fertilização, o aborto do embrião é uma característica bastante evidente em vários cruzamentos interespecíficos.

Para resolver problemas relacionados às barreiras pós-zigóticas têm-se empregado a cultura de tecidos vegetais, mais especificamente a técnica denominada resgate de embriões. Esta técnica consiste no isolamento e no cultivo *in vitro* de embriões zigóticos (Rappaport, 1954; Manzur et al., 2015). Considerada útil não só para a obtenção de híbridos, mas também para a superação de dormência das sementes e para encurtar os ciclos de reprodução em *Capsicum* (Manzur et al., 2013, 2014, 2015; Walter et al., 2018).

Os objetivos deste trabalho foram: (I) usar a caracterização molecular para confirmar os genótipos da espécie *C. annuum* (UENF 1632 and UENF 1623), (II) verificar as possíveis causas da incompatibilidade do cruzamento entre UENF 1632 x UENF 1623, e (III) superar esta incompatibilidade com o resgate de embriões.

3.1.2. REVISÃO

3.1.2.1. *Capsicum annuum* var. *annuum*

O gênero *Capsicum* tem como origem a região da Bolívia, sendo a espécie *C. chacoense* o ancestral comum. Sua dispersão para os Andes e terras baixas da Amazônia foi possível por meio de pássaros migratórios (Stommel e Bosland, 2005; Moscone et al., 2007). A domesticação das espécies *C. annuum* e *C. frutescens* foi realizada na Mesoamérica e *C. chinense*, *C. baccatum* e *C. pubescens* na América do Sul (Pickersgill, 2007)

O Brasil é considerado centro secundário de diversidade das espécies domesticadas como *C. annuum* var. *annuum*, *C. baccatum* var. *pendulum*, *C. frutescens* e *C. chinense*. O centro de diversidade da espécie *C. annuum* var. *annuum* inclui o México e a América Central (Embrapa, 2007). Como centros secundários há o centro e sudeste da Europa, África, Ásia e partes da América Latina. Devido às viagens de Cristóvão Colombo, as sementes foram levadas para as colônias portuguesas e espanholas na África, Índia e Ásia e também para o Velho Mundo, resultando em centros secundários nestes locais (IBPGR, 1983).

O pimentão e as pimentas são Angiospermas, divisão Spermatophyta, classe Magnoliopsida, ordem Solanales, família Solanaceae, gênero *Capsicum*, com 35 espécies identificadas, sendo cinco domesticadas: *Capsicum annuum* L., *C. baccatum* L., *C. chinense* Jacq, *C. frutescens* L., e *C. pubescens* Ruiz e Pav. (Carrizo, et al., 2013; Moscone, et al., 2007). Entre as espécies domesticadas, *C. pubescens* é a única que não tem registro de cultivo no Brasil (Barbieri e Neitzke, 2008).

As plantas de *Capsicum* são diploides, apresentando dois grupos de acordo com o número básico de cromossomos: um com $n=x=12$ e outro com $n=x=13$ cromossomos (Moscone et al., 2007).

No gênero *Capsicum*, são encontrados os complexos gênicos e por definição um complexo reúne espécies que apresentam cruzamentos compatíveis, embora existam dificuldades em obter alguns híbridos dentro destes complexos (Tong e Bosland, 1999).

A variedade *C. annuum* var. *annuum* tem como características flores solitárias, corola branca, anteras azuis, ausência de manchas na corola e de constrição anular na junção do cálice com o pedicelo. O cálice das flores é pouco dentado e não possui constrição anelar na junção do pedicelo. Os frutos possuem múltiplas cores e formas, polpa firme e sementes de cor clara (Carvalho e Bianchetti, 2008).

As espécies domesticadas de *Capsicum*, em relação ao sistema reprodutivo, são autógamas, contudo existe uma possível taxa de alogamia que pode ser facilitada por alterações morfológicas na flor, pela ação de insetos polinizadores e por práticas de cultivo, entre outros fatores (Tanksley, 1984; Nascimento et al., 2006). Uma característica exclusiva do gênero *Capsicum* é a pungência, que é atribuída à presença de capsaicinoides. Tais alcaloides se acumulam na superfície da placenta e são liberados quando o fruto sofre qualquer dano físico (Carvalho et al., 2003). Os capsaicinoides constituem um grupo de 12 ou mais alcaloides relacionados. A capsaicina [(*E*)-*N*-(4-hidroxi-3-metoxibenzil)-8-metil-6-nonenamida] e a dihidrocapsaicina são responsáveis por mais de 90% da pungência. Os capsaicinoides são utilizados na composição de medicamentos para aliviar dores musculares, reumáticas, inflamações, queimaduras, nevralgias, lombalgia, torcicolo entre outros (Bianchetti e Carvalho, 2005).

3.1.2.2. Melhoramento de *Capsicum*

O melhoramento genético de plantas é uma ciência que contribui para o desenvolvimento de novas cultivares, apresentando um maior potencial de rendimento, qualidade industrial e nutricional, resistência a doenças, adaptabilidade e estabilidade em diferentes regiões, além de outros fatores (Floss, 2003).

As principais espécies de *Capsicum* que estão envolvidas nos programas de melhoramento no mundo são *C. annuum*, *C. baccatum*, *C. chinense*, e *C. frutescens*, com a finalidade de explorar a diversidade do gênero (Wagner, 2003).

Os métodos de melhoramento utilizados em plantas autógamas, como as pimenteiras, geralmente envolvem hibridação de novas fontes de variabilidade, embora em populações com alta variabilidade possam ser utilizados métodos baseados em seleção. Os principais métodos utilizados são: Genealógico, Single Seed Descent (SSD) e Bulk (Wagner, 2003; Riva et al., 2007; Reifschneider e Ribeiro, 2008).

Os híbridos em *Capsicum* são obtidos por polinização manual, emasculação ou por linhagens com macho esterilidade (Nascimento et al., 2006; Rêgo et al., 2011a). A hibridação manual é o método mais empregado pelos pesquisadores para promover a fecundação cruzada em pimenteiras (Rêgo et al., 2011a).

3.1.2.3. Hibridação e Viabilidade dos Híbridos

A hibridação é uma ferramenta muito importante para os programas de melhoramento genético, pois permite a ampliação da variabilidade genética existente. Pode ser usada com o objetivo de transferir genes, de uma espécie silvestre para a forma cultivada, complementando a forma cultivada com um ou mais fatores desejáveis, resultando na produção de novas variedades com as características desejadas (Rick e Chételat, 1995; Hajjar e Hodgkin, 2007).

Barreiras pré e pós-fertilização são na maioria das vezes os limitantes no processo de hibridação intra e interespecífica. Barreiras de pré-fertilização são resultantes da falta de germinação dos grãos de pólen e do retardamento ou inibição do crescimento do tubo polínico. Como principais barreiras de pós-fertilização encontra-se a morte do embrião ocasionado pela degeneração do

endosperma e a esterilidade total ou parcial das plantas híbridas (Prestes e Goulart, 1995).

Segundo Jansky (2006) na maior parte dos cruzamentos interespecíficos são produzidas sementes inviáveis devido à falha na formação do endosperma. A hibridação interespecífica se tornou uma ferramenta indispensável para introgrear genes de interesse entre espécies de *Capsicum*. Yoon et al. (2006), trabalhando com introgressão de genes de resistência da espécie de *Capsicum baccatum* para a espécie cultivada *Capsicum annuum*, observaram o aborto dos embriões sendo este o primeiro fator responsável pela incompatibilidade interespecífica entre as espécies, com aborto no estágio de embrião globular, ocorrendo 15 dias após a polinização. Diversos trabalhos têm sido realizados com ênfase na hibridação entre espécies de *Capsicum*. Estudos recentes sobre cruzamentos intra e interespecíficos no gênero demonstraram que as taxas de pegamento podem variar de 0 a 29% no cruzamento entre *C. annuum* e *C. chinense* (Rêgo et al., 2009).

A obtenção de híbridos entre espécies de *Capsicum* é possível, porém com certas restrições como: obtenção de híbridos em apenas uma direção do cruzamento e produção de sementes híbridas viáveis restritas a cruzamentos entre determinados acessos, ocorrendo baixa porcentagem de formação de sementes viáveis (Bapa Rao et al., 1992; Campos, 2006). Desse modo, faz-se necessário o uso de outras técnicas para obter resultados consistentes.

Segundo Rêgo et al. (2011b) a hibridação entre variedades de uma mesma espécie, em geral, produz boa quantidade e qualidade de sementes. Porém isto não foi observado por Silva et al. (2017) ao realizarem cruzamentos entre os acessos UENF 1632 e UENF 1623 de *C. annuum* com potencial ornamental. Neste caso, faz-se necessário o uso de outras técnicas para obter resultados consistentes, como o resgate de embriões.

3.1.2.4. Cultura de embriões *in vitro*

Os avanços da biotecnologia contribuem grandemente para o aumento do potencial de produtividade de um grande número de espécies agrônomicas, onde a cultura de tecidos se destaca (Borém e Miranda, 2013).

A cultura de tecidos vegetais consiste em utilizar a totipotência celular, ou seja, a capacidade de regeneração de plantas a partir de células isoladas não

diferenciadas ou de órgãos e tecidos vegetais. A cultura de tecidos consiste no crescimento e multiplicação de células, tecidos e órgãos, denominados explantes, com a utilização de soluções nutritivas em um ambiente asséptico e controlado (Loyola-Vargas e Vázquez-Flota, 2006; Davey e Anthony, 2010; Borém e Miranda, 2013).

Diversos trabalhos utilizaram as técnicas de cultura de tecidos, como indução de haploides androgênicos por meio de cultura de anteras (Nowaczyk et al., 2009; Luitel e Kang, 2013), regeneração de plantas de pimenteiras a partir de protoplastos (Prakash et al., 1997; Lim e Lian, 2001), embriogênese (Khan et al., 2006), organogênese (Sanatombi e Sharma, 2008), micropropagação (Ezura et al., 1993) e cultura de embriões (Manzur et al., 2014; Walter, 2015).

A cultura de embriões também conhecida como resgate de embriões é empregada nos processos de crescimento do embrião zigótico *in vitro*, independentemente da idade, tamanho e estágio de desenvolvimento em que o embrião foi excisado (Rappaport, 1954). É utilizada para a obtenção de híbridos de *Capsicum* (Yoon et al., 2006), como também para superação de dormência das sementes ou esterilidade e encurtar os ciclos de reprodução (Manzur et al., 2013; Manzur et al., 2014).

O resgate de embriões mostrou-se muito útil aos programas de melhoramento de *Capsicum*, pois permite a regeneração de embriões independente do estágio de desenvolvimento ou idade, conforme mostrado por Manzur et al. (2013) e Walter (2015). Possibilita também que híbridos antes não obtidos por problemas de incompatibilidade pós-zigótica, possam ser utilizados para a produção de fontes de variabilidade genética. Esta técnica foi aplicada para superar as barreiras genéticas de pós-fertilização em alguns cruzamentos entre *C. annuum* × *C. frutescens* (Hossain et al., 2003) e *C. annuum* × *C. baccatum* (Yoon et al., 2006), evidenciando assim que pode ser usada para o resgate de embriões em cruzamentos de *Capsicum*.

3.1.3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1.3.1. Germoplasma

Para este trabalho foram utilizados os genótipos de *Capsicum annuum* var. *annuum* UENF 1632 e UENF 1623, com potencial ornamental, para realização dos cruzamentos, do banco de germoplasma da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, já caracterizados por meio de descritores morfológicos por Silva et al. (2015 e 2017) (Figura 1).



Figura 1. Acessos utilizados como parentais. A) UENF 1623; B) UENF 1632. Silva, 2015.

A pesquisa foi realizada no Setor de Horticultura do Laboratório de Fitotecnia (LFIT), do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA), da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, em Campos dos Goytacazes, cujas coordenadas locais de referência são 21° 45' de latitude Sul e 41° 20' de longitude Oeste e altitude média de 11 metros.

3.1.3.2. Caracterização molecular

3.1.3.2.1. Extração do DNA

Para confirmação das espécies, folhas dos dois genótipos (UENF 1623 e UENF 1632) e três genótipos comerciais de *Capsicum*, *C. annuum* L. var. *annuum* (pimentão 'Casca Dura Ikeda', TopSeed®), *C. frutescens* (pimenta malagueta) e *C. chinense* (pimenta tipo biquinho, UENF 2154) foram testados. As análises

moleculares foram realizadas no Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da UENF.

As amostras de folhas jovens foram coletadas em *bulk*, colocadas em envelopes de papel alumínio, identificadas, imersas e transportadas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultrafreezer a uma temperatura de -86°C . Posteriormente, cerca de 300 mg de tecido macerado em nitrogênio líquido foram transferidos para microtubos (2,0 mL), devidamente identificados. A extração do DNA genômico seguiu o procedimento descrito por Doyle e Doyle (1987), com modificações (Daher et al., 2002).

3.1.3.2.2. Condições de amplificação por microssatélites

Vinte pares de iniciadores microssatélites, desenvolvidos, otimizados e validados para mapeamento de *C. annuum* foram utilizados para a caracterização molecular (Minamiyama et al., 2006; Moulin et al., 2015) (Tabela 1). Após a realização do gradiente de temperatura, as reações de amplificação foram preparadas para um volume final de 13 μL por amostra, contendo: 6,08 μL de água ultrapura, 1,3 μL do tampão de PCR (1x), 1,5 μL de dNTPs, 1,0 μL de cloreto de magnésio, 1,0 μL do iniciador, 0,12 μL da enzima Taq polimerase e 2,0 μL de DNA.

Tabela 1. Iniciadores microssatélites usados na genotipagem de genótipos de *Capsicum*. UENF, Campos dos Goytacazes, 2019.

<i>Primer</i>	Iniciator Forward (5'-3')	<i>Primer</i>	Iniciator Forward (5'-3')
CAMS-215	cgtgggtggtctaggatgat	HPMS AT 214	ttaggggttccaactcttctcc
CAMS-398	atggtccatggtcagcagat	HPMS 13	tgggaaataggatgcgctaaacc
CAMS-340	tttatgcccattcacaaaataa	HPMS 141	gggtatcatccgttgaaagtagg
CAMS-451	tgcatgtggtgggctaacata	HPMS 1139	ccaacagtaggacccgaaaatcc
CAMS-606	gactagtccccgttcaacca	HPMS AT 220	tgactgtctgtgttaaaatgacg
CAMS-855	aagtgtcaaggaaggggaca	HPMS E 014	cttgcaacatttcttggggg
HPMS 11	tcaaccaatattaaggtcacttc	HPMS 143	aaccagcaatcccatgaaaacc
HPMS 15	ccaaacgaaccgatgaacactc	HPMS 162	catgagggtctcgcatgatttcac
HPMS 1117	acccaaattgccttgatgat	HPMS 1148	ggcggagaagaactagacgattagc
HPMS 1173	tgctgggaaagatctcaaaagg	HPMS 1216	tgctgtgtgtttaccctgagc

Os fragmentos amplificados foram separados em gel de agarose de alta resolução Metaphor 4% e corados com 6 µL da mistura gel *red* e *blue juice* na concentração 1:1. Para estimar o tamanho dos fragmentos, foi utilizado marcador de 100 pares de base DNA *Ladder* e submetidos à luz ultravioleta (Fotodocumentador Minibis Pro – Bio-imaging System) para visualização dos resultados. As imagens dos géis foram capturadas para posterior análise.

Os dados da amplificação dos iniciadores SSR foram convertidos em código numérico por loco para cada alelo. Foi construída uma matriz de dados numéricos na qual foram atribuídos valores de um até o número máximo de alelos encontrados por loco. A partir dessa matriz numérica, foi calculada a distância genética entre os acessos estudados, com o auxílio do programa GenAlEx (Peakall e Smouse, 2012), utilizando-se o índice de Smouse e Peakall.

Foi realizada análise de agrupamento baseada em modelo bayesiano para determinar o número ótimo de clusters genéticos, utilizando-se o programa *Structure* 2.3.4 (Pritchard et al., 2000), de acordo com o método descrito por Evanno et al., (2005), com 10.000 repetições. Foram testados valores de K entre um e 40, com 10 interações independentes para cada grupo, montando dendrograma UPGMA.

3.1.3.3. UENF 1632 x UENF 1623

3.1.3.3.1. Hibridação

Sementes dos acessos UENF 1623 e UENF 1632 foram semeadas em bandejas de poliestireno com 128 células contendo substrato comercial Basaplant® Hortaliças e mantidas em casa de vegetação coberta com filme agrícola de 150 µm de espessura e tela de sombreamento de 35%, localizada na Unidade de Apoio à Pesquisa (UAP) do CCTA/UENF com irrigação automática duas vezes ao dia. O transplântio foi realizado quando as mudas apresentaram de quatro a seis folhas definitivas, com aproximadamente 10 cm de altura, transferindo-as para vasos plásticos com capacidade para cinco litros, contendo uma mistura de substrato comercial Basaplant® e areia na proporção de 1:1. Cada vaso conteve uma planta.

As hibridações foram realizadas entre as 06:00 AM e 07:30 AM durante abril e maio de 2017, com temperatura média de 21°C. Para a realização dos cruzamentos foi empregado metodologia já estabelecida (Nascimento et al., 2012; Martins et al.,

2015; Silva et al., 2017). Os botões florais fechados e entumecidos do genitor masculino (UENF 1623) foram coletados para retirada do pólen. O pólen obtido de cada genitor foi armazenado em geladeira dentro de vidros âmbar contendo sílica-gel, devidamente identificados. Os botões florais das plantas do genitor feminino (UENF 1632) foram emasculados antes da antese. No mesmo período, a polinização foi feita colocando-se os grãos de pólen de cada um dos genitores masculinos sobre o estigma de cada flor emasculada. As flores polinizadas manualmente foram cobertas com sacos de papel antes da antese, para evitar algum tipo de contaminação. A eficiência de hibridação (EH), em porcentagem, foi calculada por meio da seguinte expressão (Silva et al., 2017):

$$\text{EH: (nº de cruzamentos efetivos/ nº de cruzamentos executados) X 100}$$

3.1.3.3.2. Germinação de sementes

Teste de germinação com sementes F_1 e dos parentais (UENF 1623 e UENF 1632) foram realizados conforme a 'Regras para Análise de Sementes' (RAS), com modificações (Brasil, 2009). Os testes foram realizados entre papel em gerbox com duas folhas de papel germiteste cortados no tamanho da caixa, com quatro repetições de 25 sementes dos híbridos e dos dois parentais, postas em B.O.D., com temperatura alternada de 30°C (luz) e 20°C (escuro), fotoperíodo de 8/16h de luz/escuro. O papel utilizado para a germinação das sementes foi molhado com água ou 0,2% de solução aquosa de KNO_3 , em uma quantidade de 2,5 a 3,0 vezes a massa do papel, sendo irrigadas novamente apenas com água à medida que necessário.

A avaliação da germinação foi realizada aos 14 dias, conforme recomendação pela RAS (Brasil, 2009). Uma segunda contagem foi feita aos 17 dias. Foram avaliados: número de plântulas normais, de sementes não germinadas e de sementes com protrusão da raiz primária, o IVG (índice de velocidade de germinação) conforme fórmula de Maguire (1962) e a germinação acumulada.

3.1.3.3.3. Análise biométrica das sementes

De acordo com a metodologia de Dias et al. (2013) para biometria, 100 sementes dos parentais (UENF 1623 e UENF 1632) e do híbrido F₁ foram selecionadas aleatoriamente, sendo comprimento, largura e espessura (mm) verificadas com paquímetro eletrônico e a massa (g) por meio de balança de precisão.

3.1.3.3.4. Caracterização morfológica das sementes

Foram utilizadas 50 sementes do híbrido e dos parentais, escolhidas aleatoriamente, para a descrição morfológica das sementes de acordo com metodologia de Abud et al. (2017). Foram considerados aspectos externos e internos das sementes. Para as observações morfológicas internas, as sementes foram previamente imersas em água destilada por 24 horas, para amolecimento e hidratação dos tecidos, facilitando a identificação das diferentes estruturas. Após esse período, foram realizados cortes longitudinais transmedianos e transversais, utilizando-se lâminas de aço descartáveis. A observação das estruturas foi realizada em microscópio estereoscópico Carl Zeiss com câmera digital AxioCam ERc 5s.

3.1.3.3.5. Caracterização histoquímica das sementes

Para as análises histológicas as sementes do híbrido e dos parentais foram embebidas em água por 24 horas e posteriormente fixadas em solução aquosa contendo glutaraldeído 2,5%, formaldeído 4,0% e tampão cacodilato de sódio 0,05 mol L⁻¹ em pH 7,3 (Da Cunha et al., 2000; Klein et al., 2004).

As sementes foram lavadas, durante 60 minutos, em tampão cacodilato de sódio 0,05 M e desidratadas em série etílica (10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% e 90%) e três vezes em etanol absoluto por uma hora em cada etapa. As sementes foram infiltradas em Histo-resina[®] usando uma série crescente de resina em etanol. A polimerização da resina foi feita a temperatura ambiente.

Depois da polimerização da resina, foram feitos cortes finos no material (5-7 µm de espessura) em micrótomo rotativo (SM 2010R, LEICA, Alemanha) com auxílio de faca de tungstênio. As secções foram dispostas em lâminas, coradas com azul de toluidina O 0,05% (Johansen, 1940; Sass, 1940; Feder and O'Brien, 1968) e

postas em lâminulas e Entellan®. A observação foi realizada em microscópio óptico de campo claro (Axioplan Zeiss®). As imagens foram capturadas por meio da câmera Cannon® Power Shot 14 mpixel (acoplada ao microscópio) com o auxílio do programa Axiovision (Zeiss, Oberkochen, Germany).

Para as análises histoquímicas o material seccionado foi disposto em lâminas e submetido a diferentes corantes e reagentes. Para lipídios, o material foi corado com Sudan IV 0,03% por 15 minutos (Pearse, 1980, adaptado). Para proteína, o material foi corado com azul Brilhante de Comassie 0,25% por 10 minutos (Fischer, 1968 adaptado). Para amido o material foi corado com reagente de Lugol por 5 minutos (Johansen, 1940, adaptado).

3.1.3.4. Resgate de embriões *in vitro*

Os frutos foram coletados a partir do 40º dia após a fecundação do cruzamento entre UENF 1632 x UENF 1623 e da autofecundação dos parentais. O experimento com cultivo de embriões cotiledonares teve como base o trabalho de Walter et al. (2018). As sementes foram desinfestadas por um minuto em álcool 70% (v/v), posteriormente imersas em 80 mL de solução de hipoclorito de sódio (NaClO) a 0,7% com adição de duas gotas de Tween 20 por 15 minutos e lavadas por três vezes em água desionizada e autoclavada nos tempos de 5, 10 e 10 minutos em fluxo laminar, respectivamente, e deixadas de molho na quarta água por 12 horas antes do isolamento dos embriões cotiledonares.

Com auxílio de microscópio estereoscópico (Tecnival®), pinça e bisturi, os embriões cotiledonares foram isolados e colocados em placas de Petri com meio de cultura contendo metade da concentração dos sais minerais do MS, complexo vitamínico de White (Murashige e Skoog, 1962), 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, com pH ajustado para 5,7± 0,1 e solidificado com 2 g L⁻¹ de Phytigel Sigma® antes da autoclavagem por 15 minutos a 121°C e 1,1 atm de pressão. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com cinco concentrações de sacarose (0, 5, 10, 15 e 20 g L⁻¹) e três combinações de fitorreguladores Sigma® (0,057 µmol L⁻¹ de ácido indolacético-AIA com 0,046 µmol L⁻¹ de zeatina-ZEA e 0,057 µmol L⁻¹ de AIA com 0,029 µmol L⁻¹ de ácido giberélico-GA₃ e na ausência dos mesmos) com quatro repetições. Cada repetição foi constituída por uma placa de Petri (60 x 15 mm) contendo 10 mL de meio de cultura e cinco embriões.

O experimento foi mantido em sala de cultivo, no escuro, por sete dias, a temperatura de 27 ± 2 °C. Posteriormente, as placas foram transferidas para luz, fotoperíodo de 16:8 horas luz:escuro e irradiância de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ provida por lâmpadas fluorescentes OSRAM® luz do dia. Ao final de 17 dias foi avaliada a porcentagem de germinação de plântulas normais.

Após a germinação *in vitro*, as plântulas do híbrido F₁ foram transferidas para frascos ventilados por membranas M2 proposto por Saldanha et al. (2012) para aumentar as trocas gasosas. O meio utilizado foi composto por metade da concentração dos sais minerais do MS, complexo vitamínico de White (Murashige e Skoog, 1962), 100 mg L^{-1} de mio-inositol, com pH ajustado para $5,7 \pm 0,1$, 20 g L^{-1} de sacarose e solidificado com 2 g L^{-1} de Phytigel Sigma® antes da autoclavagem por 15 minutos a 121°C e 1,1 atm de pressão. As plântulas permaneceram por 45 dias na luz nas mesmas condições ambientais do experimento anterior. Ao final deste período foram avaliadas: sobrevivência, comprimento da parte aérea e da raiz.

3.1.3.5. Aclimatização e fertilidade do híbrido

As plantas *in vitro* do híbrido F₁ com aproximadamente quatro centímetros de altura foram colocadas em bandejas plásticas com capacidade de 300 mL por célula, contendo substrato Basaplant®. As plantas foram transferidas para casa de vegetação coberta com filme agrícola de 150 μm de espessura e tela de sombreamento de 35%, na Unidade de Apoio à Pesquisa da UENF onde foi avaliada a taxa de sobrevivência ao final de 30 dias.

A autopolinização do F₁ foi garantida por meio da proteção de quarenta botões florais com sacos de papel, para verificar a fertilidade do híbrido. Os botões foram ensacados antes da antese, sendo avaliadas a porcentagem de produção de frutos e a porcentagem de germinação da progênie F₂ de acordo com metodologia padrão da RAS já mencionada. A avaliação da germinação foi realizada aos 14 dias.

3.1.3.6. Análise estatística

Foram verificadas as pressuposições de normalidade e de homogeneidade de variâncias dos tratamentos, respectivamente, pelos testes de Lilliefors e Cockram

e Bartlett, para que os dados pudessem ser submetidos à análise de variância (ANOVA). Em seguida, os dados foram submetidos à comparação de médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As variáveis foram analisadas com o programa SISVAR versão 5.4 (Ferreira, 2011).

3.1.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1.4.1. Caracterização molecular

A análise Bayesiana foi utilizada para classificar os acessos, considerando os dados moleculares. O maior valor de ΔK foi obtido quando dois grupos foram formados, obtendo-se os grupos I e II (Figura 2). O Grupo I agrupou três acessos, o pimentão 'Casca Dura Ikeda' e as duas espécies UENF 1632 e UENF 1623 utilizadas no cruzamento. O grupo II foi formado por *C. frutescens* e *C. chinense* (Figura 3 e 4).

Com base nas análises moleculares, verificou-se que os genótipos UENF 1632 e UENF 1623 utilizados no cruzamento são, de fato, *Capsicum annuum* corroborando com a caracterização morfológica realizada com esses genótipos por Silva et al. (2015, 2017). Portanto, o cruzamento UENF 1632 e UENF 1623 é intraespecífica, o que confirma a existência de um problema de incompatibilidade entre esses dois genótipos da mesma espécie.

Além disto, verifica-se que as espécies *C. chinense* e *C. frutescens* formaram um grupo único, mesmo sendo de complexos gênicos diferentes. O que dá mais embasamento para reflexão sobre os critérios para a formação dos complexos gênicos.

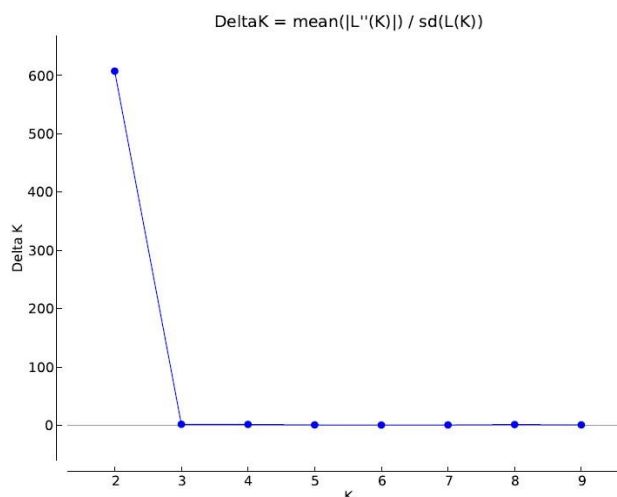


Figura 2. Número ótimo de *clusters* genéticos obtidos a partir da análise Bayesiana pelo programa Structure 2.3.4, para os cinco genótipos de *Capsicum*. UENF, Campos dos Goytacazes, 2019.

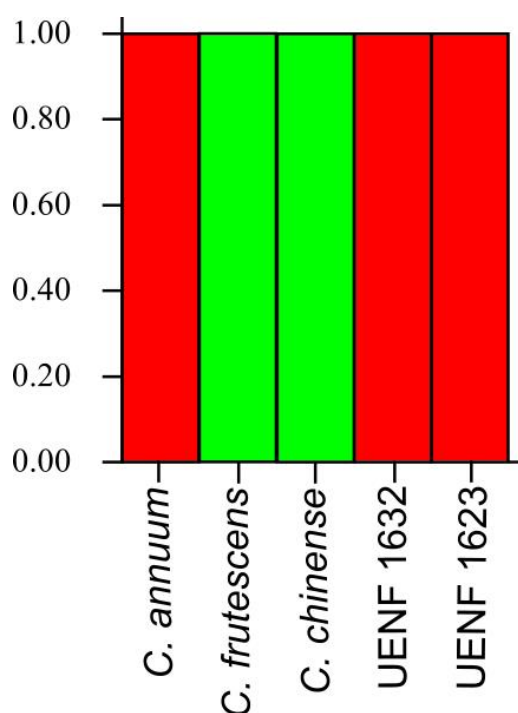


Figura 3. Estimativas da estrutura genética para cinco genótipos de *Capsicum* por 16 iniciadores microssatélites. Os acessos são representados na linha vertical e cada grupo genético é representado por uma cor. UENF, Campos dos Goytacazes, 2019.

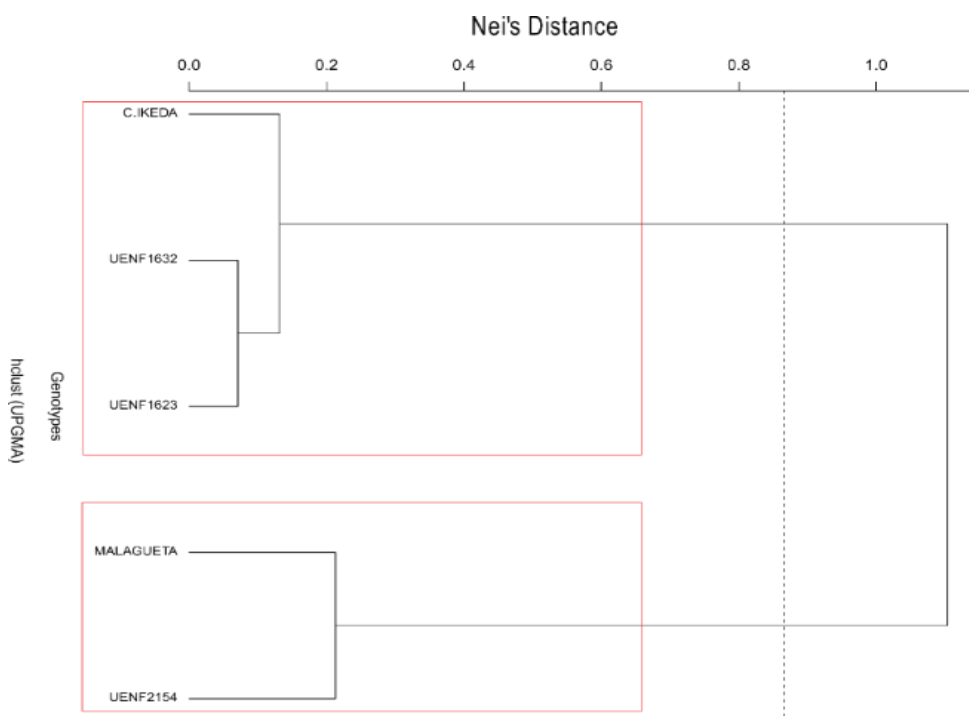


Figura 4. Dendrograma de dissimilaridade genética entre cinco genótipos de *Capsicum*, obtido pelo método UPGMA, com base nas variáveis moleculares. UENF, Campos dos Goytacazes, 2019.

3.1.4.2. Causas da incompatibilidade da hibridação entre UENF 1632 x UENF 1623

3.1.4.2.1. Hibridação e germinação das sementes dos parentais e F₁

Trinta e quatro polinizações manuais foram efetuadas e a taxa de pegamento dos cruzamentos foi de 76,47%, obtendo-se 26 frutos e produzindo 352 sementes.

Para todas as variáveis avaliadas, não houve interação entre o genótipo e os tratamentos para a germinação em água e em solução de KNO₃. O uso de KNO₃, indicado pela RAS, não resultou em aumento na taxa germinativa para todos os genótipos. O genótipo foi o fator que contribuiu para as diferenças encontradas (Tabela 2).

Nas condições de germinação padronizadas pela RAS, houve acima de 60% de germinação das sementes dos parentais e abaixo de 2,5% no híbrido F₁ (Figura 5A). Para o IVG observa-se que os maiores índices foram encontrados nos parentais. O híbrido F₁ resultou em um IVG muito baixo (Figura 5B).

A germinação das sementes começou no sexto dia após a semeadura exceto para o híbrido F₁ (Figura 6). A RAS indica a avaliação final da germinação em *Capsicum* aos 14 dias. Porém, pode-se observar que há um aumento na germinação aos 17 dias para todos os genótipos, o que subestima o potencial de germinação destas sementes (Figura 5 e 6).

Tabela 2. Resumo da análise de variância com quadrados médios para os efeitos do genótipo (G), tratamento (T) (água e KNO₃) e sua interação na eficiência da germinação em B.O.D. das sementes dos parentais (UENF 1632 e UENF 1623) e do híbrido F₁ de *Capsicum annuum*.

F.V.	GL	QM				
		IVG	Ger. 14	Ger. 17	SNG	PR
Genotipo (G)	2	222,12 ^{**}	681,13 ^{**}	858,17 ^{**}	1026,50 ^{**}	0,80 ^{ns}
Tratamento (T)	1	2,69 ^{ns}	2,04 ^{ns}	9,38 ^{ns}	0,04 ^{ns}	0,43 ^{ns}
G x T	2	1,72 ^{ns}	0,54 ^{ns}	2,00 ^{ns}	1,17 ^{ns}	0,28 ^{ns}
Resíduo	18	1,01	5,63	3,01	4,18	0,26
C.V. %		15,51	21,81	13,93	20,19	31,59

^{ns} e ^{**} indicam não significância ou significância a P < 0,05, respectivamente. Legenda: IVG – índice de velocidade de germinação; Ger.14: germinação aos 14 dias de avaliação; Ger.17: germinação aos 17 dias de avaliação; SNG: sementes não germinadas; PR: protrusão da raiz primária.

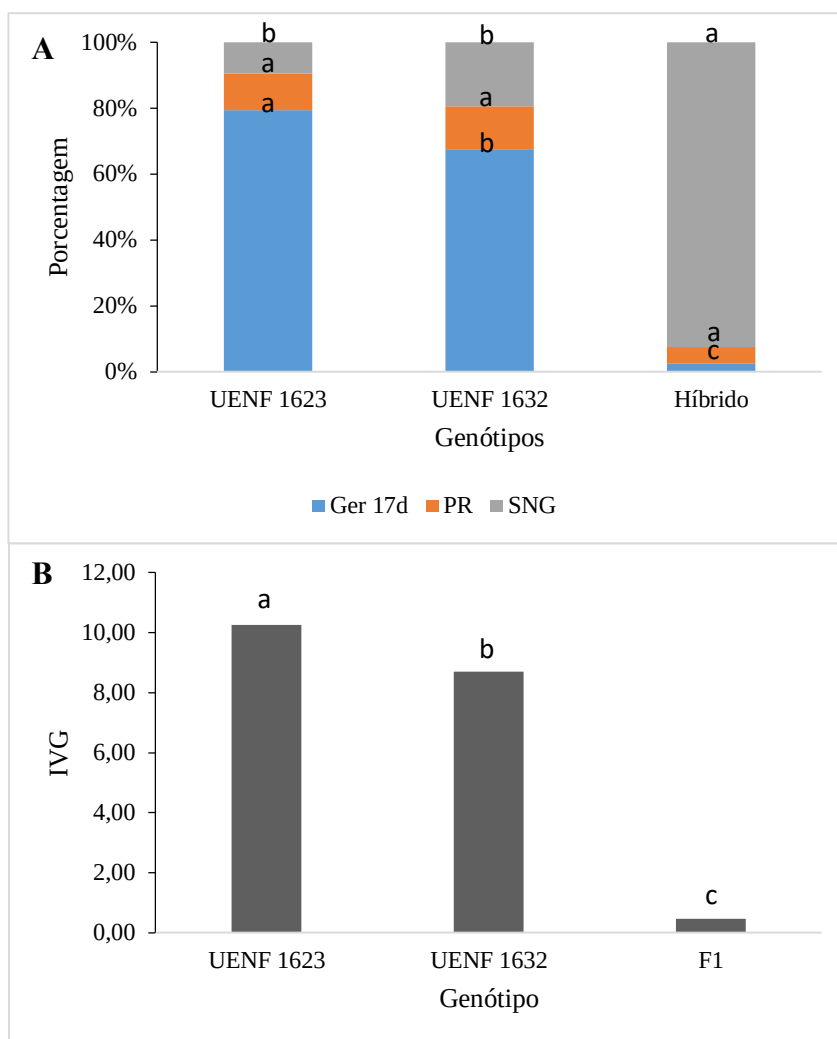


Figura 5. Teste de germinação de sementes *Capsicum annuum* dos parentais (UENF 1632 e UENF 1623) e híbrido. A) Porcentagem da germinação aos 17 dias (Ger 17d), protrusão da raiz primária (PR) e sementes não germinadas (SNG). B) Índice de Velocidade de Germinação. Colunas seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste Tukey, $P \leq 0,05$.

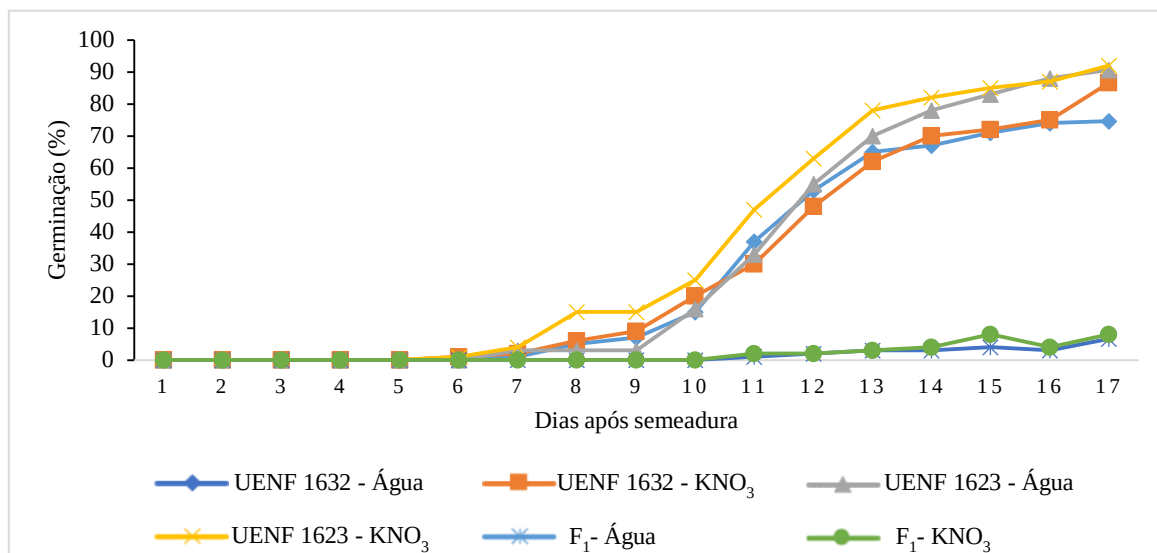


Figura 6. Germinação acumulada em B.O.D. de genótipos de *Capsicum annuum* com irrigação com água ou KNO₃.

No cruzamento UENF 1632 x UENF 1623 não há problema de produção de frutos e sementes. O problema está na germinação das sementes F₁ deste cruzamento. Em um trabalho com os mesmos acessos, a taxa de frutificação foi de 82,21%, resultando em 878 sementes, mas nenhuma semente germinou (Silva et al. 2017).

As causas da não germinação das sementes foram investigadas neste trabalho. Se a causa fosse à dormência fisiológica, seria esperado um aumento significativo na germinação com o KNO₃, o que não foi observado.

3.1.4.2.2. Análise morfológica das sementes

Analisando as sementes oriundas dos frutos do cruzamento UENF 1632 x UENF 1623 foi possível verificar que o comprimento e largura das sementes do híbrido foram iguais ao do parental UENF 1632 e superior ao parental UENF 1623. A espessura e a massa da matéria fresca de 100 sementes do híbrido foram superiores aos parentais (Tabela 3). Porém, todas as sementes do híbrido apresentaram pelo menos um tipo de alteração morfológica como: deformações, coloração mais escura e tecidos necrosados (Figura 7).

Tabela 3. Análise biométrica de sementes dos parentais UENF 1623 e UENF 1632 e de seu híbrido F₁.

Genotipo	Comprimento (mm)	Diâmetro (mm)	Espessura (mm)	Massa* (g)
UENF 1623	3,00 b	3,57 b	0,65 c	0,37 c
UENF 1632	3,16 a	3,91 a	0,74 b	0,51 b
Híbrido F ₁	3,13 a	3,89 a	0,78 a	0,58 a
Média	3,10	3,79	0,72	0,49
C.V. (%)	6,66	6,21	15,84	4,99

Médias seguidas pelas mesmas letras na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey, $P \leq 0,05$. * Massa fresca de 100 sementes.

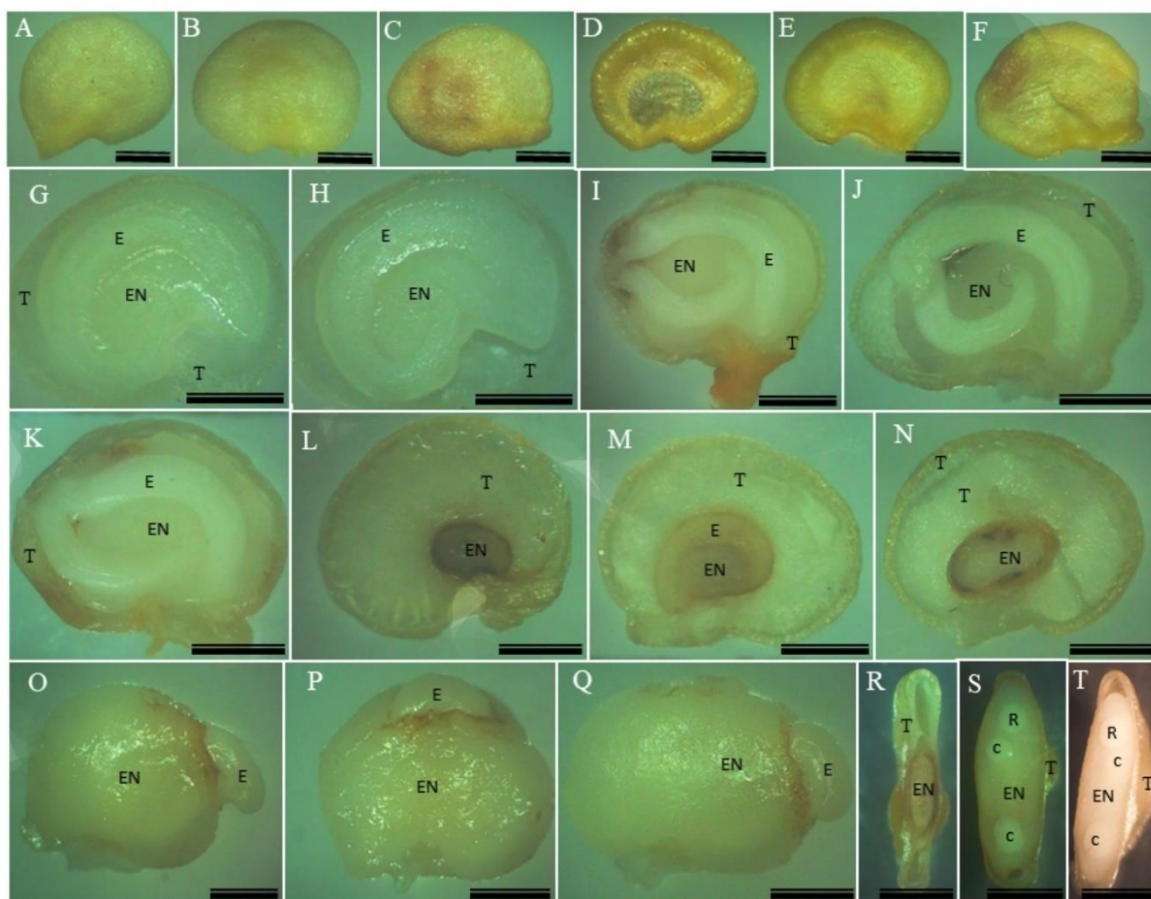


Figura 7. Aspectos morfológicos de sementes de *Capsicum annum*. Sementes inteiras secas: A) UENF 1623; B) UENF 1632; C-F) Sementes oriundas do cruzamento intraespecífico entre UENF 1632 x UENF 1623 (F₁); Corte longitudinal transmediano: G) UENF 1623; H) UENF 1632; I-N) Híbrido F₁; O-Q) Sementes sem tegumento do híbrido F₁; R-T) Corte transversal do híbrido F₁ (R-S) e parental (T). Legenda: EN= endosperma; E= embrião; T= tegumento; R= região hipocótilo-radícula; C= região cotiledonar. Barra: 1mm.

As sementes dos parentais são campilótropas com superfície do tegumento de coloração amarela e homogênea, com superfície irregular e algumas depressões e contorno longitudinal arredondado (Figuras 7A e 7B). As sementes do F₁ se diferenciam por apresentarem características irregulares como coloração escurecida, deformações no contorno e pontos necróticos (Figura 7C-F) indicando que há alterações morfológicas de fácil visualização na estrutura da semente do híbrido.

Nas Figuras 7G-T é possível visualizar as características anatômicas das sementes, por meio de cortes longitudinais transmedianos e transversais. As sementes dos genótipos são endospermáticas. O endosperma é carnoso, consistente e apresenta coloração amarelada. O embrião fica na periferia da semente, é curvo e cilíndrico com coloração branca (Figura 7G e H). O embrião é circinado (cilíndrico, enrolado em espiral, com cotilédones planos com o mesmo diâmetro do eixo hipocótilo-radícula) o que está de acordo com a descrição para Solanaceae (Castellani et al., 2008 e Dias et al., 2013).

Em corte transversal, observa-se o contorno elíptico das sementes dos parentais e do híbrido (Figura 7R-T). Devido à curvatura do embrião, ao realizar esse tipo de corte podem-se visualizar diferentes regiões do embrião, como a região cotiledonar e a radicular (Figura 7R-T).

Quando analisamos as sementes do F₁, a coloração do endosperma mostra-se escura (Figura 7I-S) principalmente quando se compara com os parentais (Figura 7G-H). Esta coloração escura pode indicar uma degradação dos tecidos do endosperma o que pode ser uma das causas da dificuldade de germinação encontrada nas sementes deste cruzamento.

Outro problema encontrado foi à exposição do embrião para fora do endosperma (Figura 7O-Q), o que pode causar injúrias no tecido do embrião levando a inviabilidade da semente. Como exemplo, nas figuras 6I-K observam-se embriões danificados e rompidos. A presença de endosperma necrótico impede que o embrião se desenvolva normalmente (Figuras 7L-N e R), o que frequentemente está relacionado com o aborto do embrião. Tal característica já foi relatada em *Capsicum* (Yoon et al., 2006; Manzur et al., 2015).

Com os estudos histológicos observa-se que o tegumento é reduzido a uma camada interna e outra externa com mesofilo colapsado tanto nos parentais (Figura 8A, B, H, O) quanto no híbrido (Figuras 8D, E, K, M, N). As sementes apresentam

tegumento externo com espessamento conspícuo da parede periclinal interna lignificado, como evidenciado pela cor azul claro. Esta lignificação do tegumento confere proteção mecânica às estruturas internas das sementes.

A epiderme consiste de uma camada interna de células com formas longas, planas e retangulares (Figuras 8A, B, O). Porém, em alguns cortes do híbrido observa-se que esta estrutura está danificada (Figuras 8D, E, K, M e N).

As células do endosperma, de todos os genótipos incluindo o híbrido, são caracterizadas por apresentarem paredes celulares mais espessas, quando comparadas às do embrião, além de apresentarem formato irregular (Figuras 8B, E, H e K). Nos parentais, este tecido reveste todo o embrião (Figuras 8A, C e I). Porém, como já observado na anatomia das sementes, em algumas sementes do híbrido o endosperma não envolve todo o embrião. Este fica em contato direto com o tegumento (Figuras 8D, N, M), o que pode contribuir para danificar os tecidos dos embriões.

O embrião consiste de eixo hipocótilo-radícula e dois cotilédones (Figuras 7S e 8C e I). As células do embrião apresentam paredes celulares delgadas e de formato isodiamétrico (Figuras 8C-N). As alterações anatômicas ficam evidentes nos cotilédones dos híbridos (Figuras 8D, F, J, M) quando comparados com os parentais (Figuras 8A, C e G). No entanto, estes ainda apresentam feixe vascular como nos parentais. Não há alterações anatômicas no eixo hipocótilo-radícula do híbrido (Figuras 8E, L) quando comparados com os parentais (Figura 8I). O que deixa evidente que o embrião do híbrido não possui estruturas anormais que possam impedir seu desenvolvimento normal.

Outro fator observado nos híbridos (Figuras 8D, E, F, K, L), e ausente nos parentais (Figuras 8A, B, C, H, I), é um maior lúmen entre o embrião e o endosperma. Essa alteração nos híbridos diminui a superfície de contato do embrião com o endosperma.

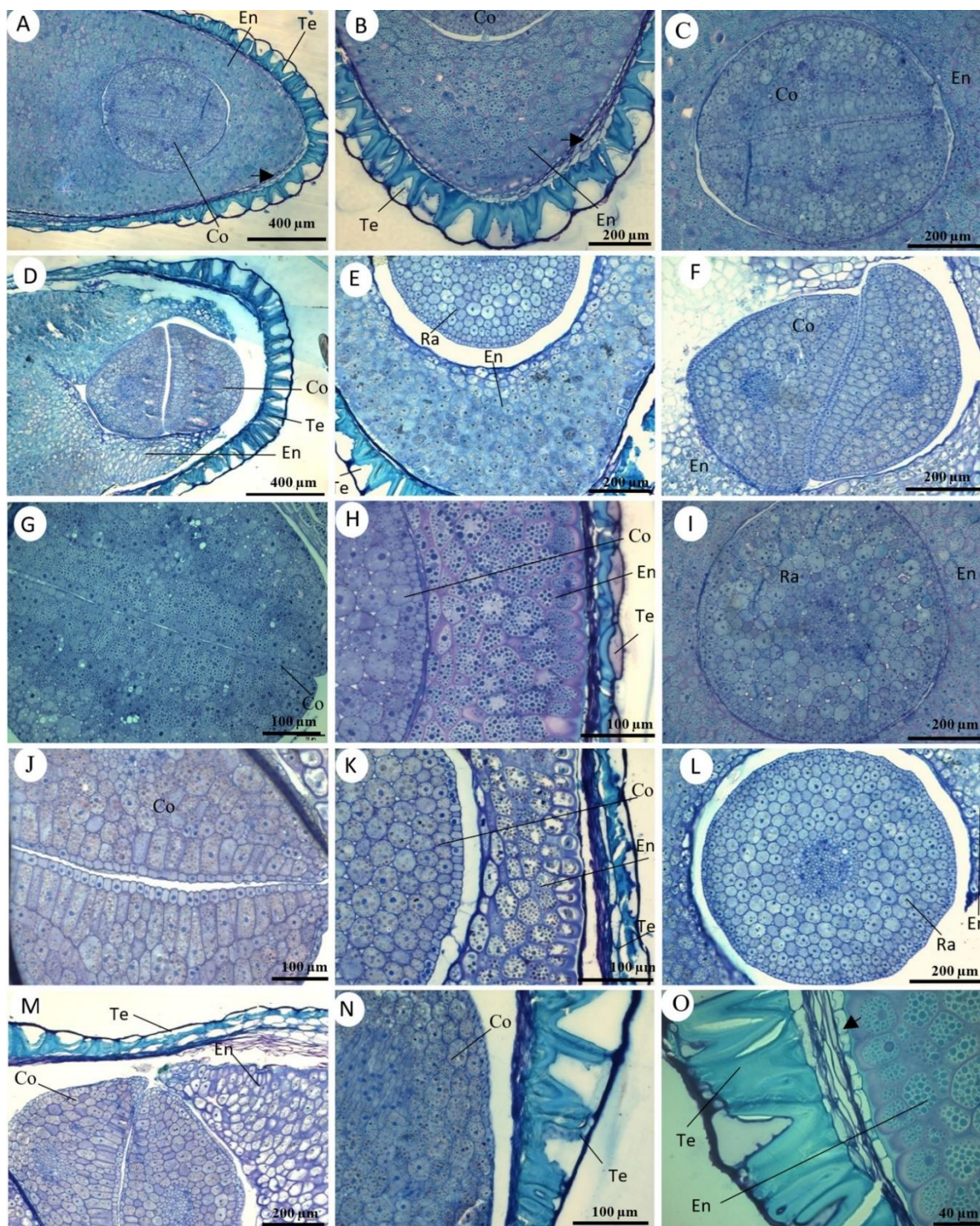


Figura 8. Histologia de sementes de *Capsicum annuum*. A-C) Parentais (UENF 1623 e UENF 1632); D-F) Híbrido F₁ (UENF 1632 x UENF 1623); G-I) Parentais (UENF 1623 e UENF 1632); J-N) Híbrido F₁ (UENF 1632 x UENF 1623); O) Parental 1623 corados com azul de toluidina. Legenda: En: endosperma; Te: tegumento; Co: Cotilédone; Ra: radícula; →: epiderme.

As sementes dos parentais e do híbrido neste trabalho foram coletadas a partir do 40º dia após a antese (DAA). Observa-se com a coloração de Lugol em marron,

ausência de grânulos de amido nas células do endosperma dos parentais (Figura 9A) e grande presença nas células do híbrido (Figuras 9B-C).

Em todos os genótipos pode-se observar a presença de proteínas, corados com Azul de Coomasie e de lipídios, corados com Sudan IV no endosperma e no embrião, sendo estes os principais compostos de reserva das sementes de *Capsicum* (Figuras 9D-G). O mesmo foi observado por Chen e Lott (1992) para *C. annuum* e por Abud et al. (2017) para *C. chinense* e *C. frutescens*.

Além dos problemas morfológicos e histológicos encontrados nas sementes do híbrido F₁ já mencionados, outras alterações foram observadas como sementes sem embriões e com embriões duplos. Não foram encontradas sementes com características normais no híbrido.

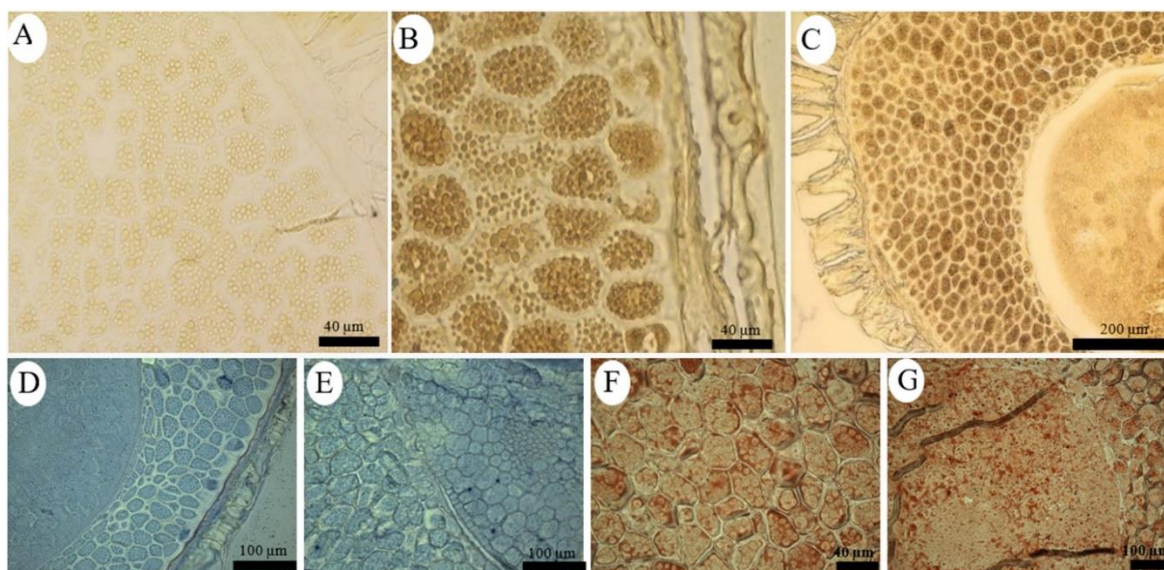


Figura 9. Cortes transversais de diferentes regiões das sementes de *Capsicum annuum*. A) endosperma e tegumento do parental UENF 1623 corado com Lugol; B) endosperma e tegumento do híbrido corado com Lugol; C) tegumento, endosperma e embrião do híbrido, corados com Lugol; D) endosperma do parental UENF 1623 corado com Azul de Coomasie; E) endosperma do híbrido, corados com Azul de Coomasie; F) endosperma parental UENF 1623 corado com Sudan IV; G) Endosperma do híbrido, corado com Sudan IV.

As análises morfológicas e anatômicas das sementes F₁ mostraram que todas as sementes apresentaram pelo menos um tipo de alteração no endosperma como: deformação, coloração mais escura e, ou presença de tecidos necrosados. Manzur et al. (2015) e Yoon et al. (2006), realizando cruzamentos intraespecíficos de

Capsicum, também observaram algumas destas alterações. No entanto, nenhum embrião deste cruzamento (UENF 1632 x UENF 1623) apresenta estrutura anormal que possa impedir seu desenvolvimento normal, com exceção dos embriões rompidos.

Estudos anatômicos de embriões oriundos de cruzamentos interespecíficos incompatíveis em *Capsicum* revelaram que a principal causa do aborto foi um endurecimento precoce do endosperma. Este fato pode ter limitado o desenvolvimento dos embriões, causando deformidades morfológicas nos mesmos e, eventualmente, colapso embrionário e sua morte (Manzur et al., 2015). No híbrido intraespecífico UENF 1632 x UENF 1623 pode ter ocorrido um endurecimento precoce do endosperma e consequente degeneração do mesmo, mas não houve alterações morfológicas significativas nos embriões, o que resultou em maior sucesso no resgate de embriões. Estes resultados sugerem que há diferentes causas de incompatibilidade pós-zigóticas em *Capsicum*.

No processo de maturação das sementes em *Capsicum* há uma diminuição gradativa na concentração de amido e aumento de proteínas e lipídios. Na maturação fisiológica, que ocorre a partir do 40º DAA, o amido não é mais encontrado, sendo proteínas e lipídios as principais reservas das sementes em *Capsicum* (Abud et al., 2017). Estes autores concluem que o amido é uma fonte de reserva transitória que é usada para o desenvolvimento do embrião, durante o processo de maturação. A ausência de amido nas sementes maduras sugere que durante a maturação, os grãos de amido são convertidos em outros compostos, provavelmente em açúcares solúveis (Zeeman et al., 2010). Segundo Jordy (2004), o amido transitório geralmente é utilizado como fonte de carbono na divisão, expansão e diferenciação de células do embrião. No entanto, no endosperma das sementes maduras do híbrido, ainda há grande quantidade de grânulos de amido (Figuras 8B-C), o que sugere que as reservas de amido do endosperma não foram totalmente mobilizadas para o embrião do híbrido. Esta pode ser uma das razões da degeneração do endosperma e dos problemas germinativos das sementes do híbrido entre UENF 1632 x UENF 1623.

3.1.4.3. Superação da barreira pós-zigótica com o resgate de embriões

Após verificar que os embriões das sementes do híbrido não apresentaram alterações morfológicas e que de fato o problema encontrado foram alterações no endosperma, o resgate de embriões foi realizado (Figura 10).

Para a germinação *in vitro* dos embriões cotiledonares não houve diferença entre os genótipos, as concentrações de sacarose e a combinação de fitorreguladores no meio de cultura. A germinação *in vitro* dos embriões resgatados do híbrido F₁ foi estatisticamente igual à dos parentais com germinação acima de 40% (Figura 11). O resgate dos embriões F₁ proporcionou a substituição do endosperma da semente com alterações fisiológicas por um endosperma artificial composto pelo meio de cultura, elevando a germinação de 2,5% em papel germiteste para mais de 40% *in vitro*. Este resultado comprova que os embriões do híbrido F₁ permaneceram viáveis após a maturação fisiológica da semente.

No crescimento do híbrido F₁ houve 100% de sobrevivência das plântulas resgatadas, após 60 dias de cultivo *in vitro*. A ausência de sacarose e fitorreguladores na germinação *in vitro* dos embriões não afetou o crescimento *in vitro* das plântulas, expresso no comprimento da parte aérea e da raiz (Figura 12).

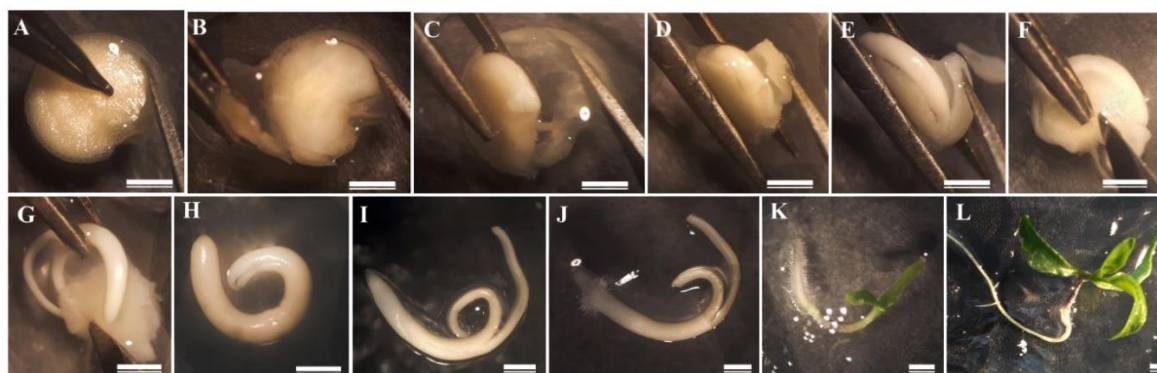


Figura 10. Estádios de excisão e desenvolvimento de embriões de *Capsicum annuum* durante o resgate de embriões *in vitro*. A-C) Remoção do tegumento; D-E) Corte no endosperma; F-G) Pressão no endosperma remanescente e remoção do embrião; H) Embrião em meio de cultura para desenvolvimento no primeiro dia; I) Embrião com 3 dias; J) Embrião com 4 dias; K) Plântula com 7 dias; L) Plântula com 15 dias. Barra = 1 mm

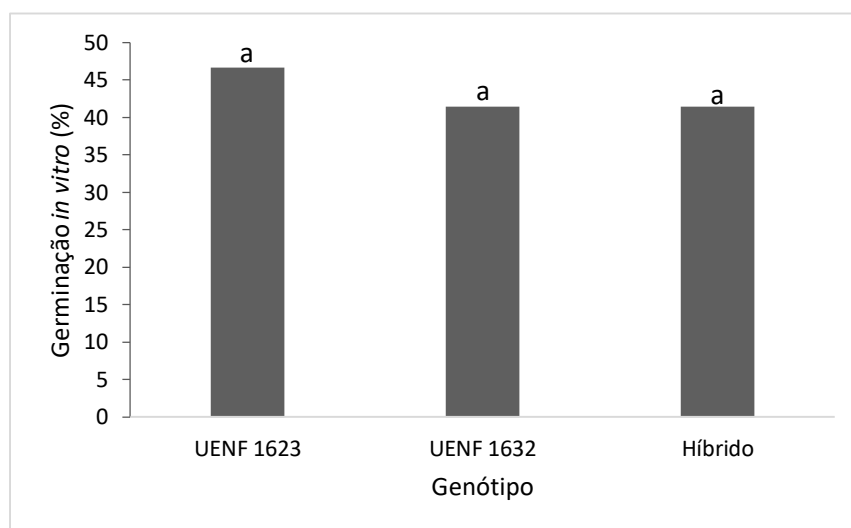


Figura 11. Germinação *in vitro* de embriões cotiledonares dos parentais (UENF 1623 e UENF 1632) e do híbrido F₁ em meio de cultura. Colunas seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste Tukey, $P \leq 0,05$.

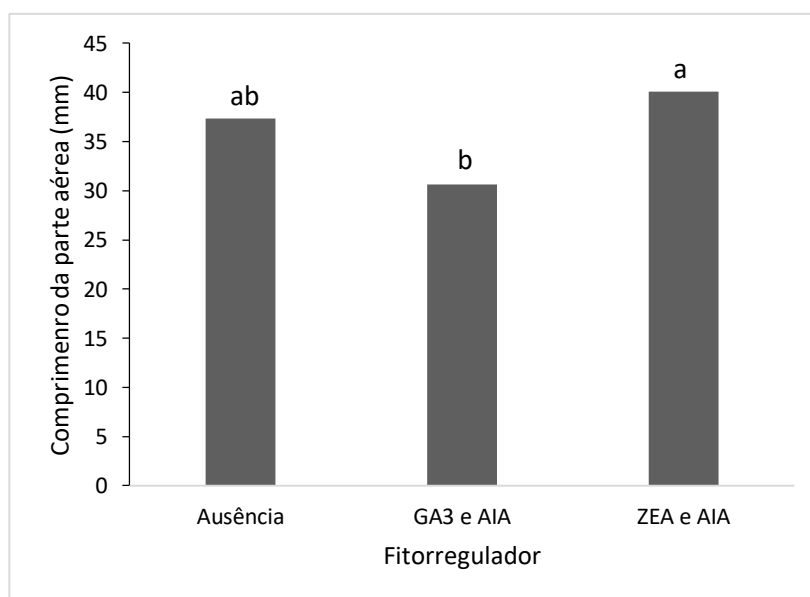


Figura 12. Influência da combinação de fitorreguladores no crescimento *in vitro* de plântulas do híbrido intraespecífico UENF 1632 x UENF 1623.

O gênero *Capsicum*, e mais precisamente *C. annuum*, é notadamente recalcitrante *in vitro*, o que dificulta a indução de respostas morfogênicas (Wijbrandi e De Both, 1993), isto é, os explantes podem não apresentar resposta morfogênica quando cultivados *in vitro* (Benson, 2000; Kothari et al., 2010). Este fato pode

justificar a taxa germinativa de 40% para os embriões de todos os genótipos (parentais e híbrido). Levando-se em consideração a taxa de germinação das sementes F₁ (UENF 1632 x UENF 1623) de 2,5% e dos embriões de 41,48%, houve um aumento de aproximadamente 1600% na obtenção de plântulas viáveis deste cruzamento.

A adição de sacarose e fitorreguladores ao meio de cultura não foi fundamental para a germinação *in vitro* dos embriões cotiledonares. Estes embriões já se encontravam fisiologicamente maduros, ou seja, eles foram capazes de biossintetizar as substâncias necessárias para sua germinação. De acordo com Walter (2015), a adição de sacarose e de fitorreguladores não é necessária durante a germinação, no entanto a adição de sacarose é necessária para o crescimento das plântulas *in vitro* de *Capsicum*. A literatura cita o uso de meios de cultura mais complexos, enriquecidos com caseína hidrolisada, extrato de levedura, água de coco, ácido giberélico e ácido naftalenoacético. Entretanto, Walter (2015) e Walter et al. (2018) relatam meios de cultura mais simples para a germinação dos embriões e crescimento das plântulas em *Capsicum*.

Fica evidente que o resgate de embriões foi a única opção para obter plantas do híbrido UENF 1632 x UENF 1623. O protocolo para resgate de embriões, desenvolvido neste trabalho, pode ser aplicado diretamente nos programas de melhoramento genético de *Capsicum* para obter híbridos de cruzamentos com incompatibilidade pós-zigótica devido a problemas de degeneração do endosperma.

Os resultados demonstram que o problema de germinação do híbrido F₁ não é causado por dormência fisiológica e nem alterações no embrião e sim por alterações morfológicas, histológicas e fisiológicas do endosperma.

Na literatura é recorrente o relato de incompatibilidade no gênero *Capsicum*, principalmente em cruzamentos interespecíficos (Charlo et al., 2009; Nascimento et al., 2012; Manzur et al., 2015; Martins et al., 2015). Relatos de incompatibilidade intraespecífica são mais raros (Nascimento et al., 2012; Silva et al., 2017). O que chama atenção são os relatos de incompatibilidade envolvendo espécies do mesmo complexo gênico, o que não seria esperado, uma vez que o cruzamento entre indivíduos de um mesmo complexo é tido como possível. Neste trabalho, evidenciou-se a incompatibilidade em um cruzamento entre indivíduos da mesma espécie (UENF 1632 x UENF 1623). Todos esses resultados sugerem que os

complexos gênicos em *Capsicum* devem ser considerados com muito cuidado, pois algumas vezes cruzamentos entre espécies de diferentes complexos genéticos podem produzir sementes híbridas férteis, não de acordo com a teoria dos complexos gênicos.

Segundo Pickersgill (1997), estudos na sistemática de *Capsicum* têm mostrado que os problemas de hibridação são similares àqueles encontrados em outras espécies da família Solanaceae de grande importância econômica como tomate, tabaco e batata. A superação dessas barreiras de incompatibilidade, segundo esta autora, é um dos mais importantes avanços no melhoramento de plantas, permitindo uma considerável expansão do conjunto gênico das espécies.

3.1.4.4. Aclimatização e confirmação da fertilidade do híbrido

Ao final de 30 dias de aclimatização em casa de vegetação houve 100% de sobrevivência das mudas dos parentais e do híbrido resgatado *in vitro* (Figura 13A e B). Os botões florais das plantas F₁ foram autofecundados resultando em 85% de produção de frutos, com uma taxa de germinação das sementes F₂ de 74% entre papel germiteste em gerbox. As sementes F₂ apresentaram coloração e formato normal, semelhantes aos parentais (Figura 13C). Este resultado confirma a fertilidade do híbrido e a superação da barreira pós-zigótica deste cruzamento.



Figura 13. Híbrido do cruzamento entre UENF 1632 x UENF 1623. A-B) Aparência geral, flor e fruto do híbrido F₁; C) Sementes do híbrido F₂. Bar = 1.0 cm.

3.1.5. CONCLUSÕES

Os resultados moleculares confirmam que os genótipos UENF 1632 e UENF 1623 pertencem à espécie *C. annuum*. Análises morfológicas, anatômicas e histoquímicas, bem como o cultivo de embriões confirmam que a incompatibilidade intraespecífica entre *C. annuum* UENF 1632 e UENF 1623 é causada pela malformação do endosperma. O resgate de embriões é eficiente na superação da barreira pós-zigótica de cruzamentos intraespecíficos entre *C. annuum*, produzindo híbridos férteis e permitindo sua utilização nos programas de melhoramento de plantas.

3.2. USO DE DIFERENTES VEDAÇÕES, SACAROSE E IRRADIÂNCIA NO CULTIVO *in vitro* DE *Capsicum annuum*

3.2.1. INTRODUÇÃO

A cultura de tecidos vegetais é uma ferramenta biotecnológica bastante utilizada para diversas finalidades, tanto para a propagação de plantas quanto para auxiliar programas de melhoramento genéticos de plantas. E consiste no emprego da totipotência celular, ou seja, na capacidade regenerativa das células, tecidos e órgãos vegetais, disponibilizando aos explantes condições apropriadas para o seu desenvolvimento. O cultivo *in vitro* é realizado em frascos com meio de cultura contendo macro e micronutrientes, vitaminas, aminoácidos, fitorreguladores, fonte de carbono e água. (Carvalho et al., 2011).

O ambiente de cultivo *in vitro* convencional em frascos tampados apresenta baixa troca gasosa e baixa iluminação. Neste sistema de cultivo *in vitro* tido como convencional, existe a vedação dos frascos com tampas rosqueáveis, filmes de alumínio, filmes plásticos transparentes (cloreto de polivinila) e tampas padrão de polipropileno. A finalidade é prevenir a desidratação dos explantes e do meio de cultura, além de evitar contaminações por microrganismos, como bactérias e fungos (Skrebsky et al., 2004).

No entanto, estas vedações constituem uma barreira a gases o que normalmente restringem as trocas gasosas entre a atmosfera interna do frasco de

cultura e a atmosfera externa da sala de cultura o que pode levar a desordens morfo-fisiológicas (Nguyen e Kozai, 2005; Zobayed, 2006).

Devido à vedação dos frascos, as taxas de transpiração e de fotossíntese são baixas, além de ocorrer dificuldade na absorção de água e nutrientes, elevada taxa de respiração no escuro o que ocasiona uma redução no crescimento dos explantes (Kozai et al., 1997). A alta umidade relativa dentro dos frascos também é problemática, uma vez que pode diminuir a deposição de ceras epicuticulares e o desenvolvimento de estômatos funcionais nos explantes (Chandra et al., 2010).

O açúcar presente no meio de cultura tem como função ser utilizado como fonte de energia, influenciando a fisiologia da planta, a diferenciação e o crescimento dos tecidos e órgãos. Como a taxa fotossintética *in vitro* é baixa há a necessidade do fornecimento dessa fonte de carbono, que no cultivo *in vitro* pode variar geralmente de 20 a 40 g L⁻¹ de acordo com o objetivo do cultivo (Calvete et al., 2002; Skrebsky et al., 2004).

No cultivo *in vitro* convencional os explantes crescem em condições heterotróficas e, ou mixotróficas, que alteram o padrão anatômico e morfofisiológico, podendo causar estresse nas plantas quando forem aclimatizadas. Por outro lado, um cultivo mais fotoautotrófico *in vitro*, com a redução da sacarose, aumento da iluminação e das trocas gasosas, pode contribuir na redução do estresse das plantas (Costa, 2012).

Uma forma de melhorar as trocas gasosas é o uso de membranas permeáveis a gases, reduzindo a umidade relativa do ar e aumentando a transpiração e a efetiva absorção de água e nutrientes pela planta. Pode ainda favorecer a manutenção da concentração de CO₂ adequada para estimular a fotossíntese e reduzir a concentração de etileno (Kozai e Kubota, 2001; Xiao et al., 2011).

Vários trabalhos têm verificado a influência das trocas gasosas na morfogênese *in vitro* de diversas espécies (Park et al., 2004; Ribeiro et al., 2009; Yoon et al., 2009; Aragón et al., 2010; Cha-Um et al., 2010), inclusive do gênero *Capsicum* (Santana-Buzzy et al., 2005; Mohamed e Alsadon, 2011).

Trabalho realizado por Walter (2015), com germinação *in vitro* de embriões isolados de pimentas (*C. annuum* L., *C. baccatum* L., *C. chinense* L. e *C. frutescens* L.), demonstra que as plantas cresceram em condições fotoautotróficas, com meio de cultura sem sacarose, no entanto com baixa troca gasosa e com baixa

intensidade luminosa (Walter, 2015). Segundo o autor, provavelmente, pode ter levado a baixa sobrevivência durante a fase de aclimatização.

Além disto, as plantas do gênero *Capsicum* apresentam alta sensibilidade ao etileno, apresentando características como clorose e abscisão foliar juntamente com a rápida perda de vigor (Santana-Buzzy et al., 2005). O que pode ser superado com o uso de recipientes com maior troca gasosa.

Desta forma, objetivou-se com este trabalho determinar a influência de diferentes vedações, intensidades luminosas e sacarose na germinação e crescimento *in vitro* de *Capsicum annuum*.

3.2.2. REVISÃO

3.2.2.1. Cultivo *in vitro* convencional

A cultura de tecidos aplicada ao gênero *Capsicum* é usada principalmente nos programas de melhoramento genético além de estudos sobre as respostas fisiológicas *in vitro*, o que gera contribuições para pesquisas com transferências de genes, eliminação de patógenos e seleção de genótipos melhorados (Kothari et al., 2010). Uma vez que este gênero não apresenta problemas de propagação, sendo utilizado suas sementes para esta finalidade.

Na forma convencional, durante o cultivo *in vitro* são utilizados frascos vedados o que leva a apresentarem baixa troca gasosa, além de possuírem baixa intensidade luminosa fornecida por lâmpadas, em geral, variando de 30 a 60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Os explantes de forma geral, não possuem o aparato fotossintético funcional, assim há a necessidade da adição de uma fonte de carbono ao meio de cultura para promover o crescimento vegetal (Skrebsky et al., 2004).

Os explantes crescem em condições heterotróficas e, ou mixotróficas, no entanto estes processos podem prejudicar seu crescimento, que geralmente é observado com maior relevância durante a fase de aclimatização (Costa, 2012).

As restrições do cultivo *in vitro* convencional tais como o elevado custo de produção, atribuído principalmente ao lento crescimento e longo período de regeneração das plantas, a elevada porcentagem de contaminação e a baixa

porcentagem de sobrevivência das plantas na aclimatização, além é claro, da mão de obra qualificada (Kozai et al., 2005). Assim trabalhos que envolvam melhorias nestas condições são de extrema importância para auxiliar na redução de custo de produção.

A alta umidade relativa no interior dos frascos e a baixa irradiância são consideradas os principais fatores envolvidos na desorganização dos tecidos vegetais, baixo funcionamento dos estômatos e a reduzida camada de cera epicuticular na anatomia foliar de plantas produzidas por cultura de tecidos. Estas características levam ao baixo controle da perda de água durante a aclimatização, onde são submetidas às condições naturais (Albany et al., 2005; Deccetti et al., 2008; Silva et al., 2008). Ou seja, a umidade relativa no interior dos frascos pode causar anomalias anatômicas que, geralmente, reduzem as taxas de sobrevivência durante a transferência para o ambiente *ex vitro* (Hazarika, 2006).

Outros problemas encontrados no método convencional são os baixos níveis de CO₂ e a produção, o acúmulo de etileno nos frascos fechados e a inibição de enzimas do ciclo de Calvin pela sacarose. Estes fatores interferem diretamente nas taxas fotossintéticas das plantas cultivadas *in vitro*, e consequentemente, alteram as taxas de multiplicação e a sobrevivência das plantas durante o processo de aclimatização (Tanaka et al., 2005; Aragón et al., 2010).

A transferência das plantas *in vitro* para condições *ex vitro* pode resultar na baixa taxa de sobrevivência durante a aclimatização, acarretando estresses fisiológicos, sendo esta a fase considerada mais delicada da cultura de tecidos (Kodym e Zapata-Aria, 1999; Kozai e Kubota, 2001).

3.2.2.2. Cultivo fotoautotrófico *in vitro*

O cultivo autotrófico *in vitro* é considerado uma alternativa para garantir maior eficiência técnica e econômica na cultura de tecidos. Diversos trabalhos têm sido realizados com o objetivo de melhorar as condições de cultivo para diversas culturas (Afreen et al., 2002; Morini e Melai, 2003; Couceiro et al., 2006; Santana et al., 2008; Barbosa, 2016).

O cultivo fotoautotrófico *in vitro* é caracterizado pelo crescimento e desenvolvimento das plantas tendo como fonte a fotossíntese e a absorção de nutrientes inorgânicos do meio de cultura (Kozai et al., 2005). Fazendo um

comparativo com o cultivo convencional, é possível reduzir o tempo de cultivo em até 30% e resolver problemas de mau funcionamento de estômatos e hiperidricidade (Afreen et al., 2002). Dentre as limitações para se obter um cultivo autotrófico adequado para a maioria das espécies estão o ajuste da concentração da sacarose e trocas gasosas.

O cultivo pode ser feito sem a fonte de carbono adicionado ao meio de cultura. Esta forma de cultivo pode ser chamada também de cultivo fotossintético *in vitro*, cultivo inorgânico ou cultivo isento de açúcar (Kozai, 1991; Kozai et al., 2005).

O cultivo fotoautotrófico *in vitro* foi desenvolvido na década de 80. Desde então vários estudos têm sido realizados para investigar os efeitos do microambiente dos recipientes de cultivo no crescimento e desenvolvimento das plantas *in vitro* (Zobayed et al., 2001; Yoon et al., 2009; Kozai, 2010).

Algumas plantas possuem a habilidade de crescer *in vitro* de forma fotoautotrófica, isto é, sem sacarose no meio de cultura e sob condições ambientais que promovam a fotossíntese (Kozai, 1991). O cultivo fotoautotrófico *in vitro*, além de poder aumentar o crescimento dos explantes, pode reduzir os riscos de contaminação microbiana e podem melhorar as características fisiológicas da planta facilitando sua aclimatização (Kodym e Zapata Arias, 1999; Afreen et al., 2002; Kozai e Nguyen, 2003; Zobayed, 2006).

A propagação *in vitro* ideal seria manter as mesmas condições do ambiente externo, como os níveis ideais de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos e a concentração de CO₂ (Xiao et al., 2011).

Um dos principais trabalhos sobre o cultivo fotoautotrófico foi o de Kozai et al. (1988) com batatas (*Solanum tuberosum* L.) em meio de cultura sem fonte de carbono, com o objetivo de desenvolver um sistema de propagação em massa, automatizado para produzir batata-semente livre de doenças. Os trabalhos de Kozai e Iwanami (1988) e Pospisilova et al. (1988) também alcançaram sucesso no cultivo fotoautotrófico de cravo (*Dianthus caryophyllus* L.) e tabaco (*Nicotiana tabacum* L.), respectivamente.

Uma forma para fornecer a entrada de CO₂ no interior dos frascos de cultivo é o uso de tampas que permitem trocas gasosas (Erig e Schuch, 2005). Aumentando as trocas gasosas, o CO₂ entra constantemente no frasco e há redução significativa nas concentrações de etileno e da umidade relativa no interior dos frascos de cultivo (Kozai e Nguyen, 2003). Com este objetivo estão sendo utilizadas membranas

porosas permeáveis a gases (Xiao et al., 2011). Kozai e Kubota (2001) relataram que as mudanças no microambiente dos frascos de cultura promovidas pelas trocas gasosas, favorecem a manutenção da concentração de CO₂, estimulam a fotossíntese e reduzem a concentração de etileno e a umidade relativa dentro dos frascos de cultivo.

3.2.2.3. Fonte de carbono

A sacarose é a fonte de carbono mais utilizada no cultivo *in vitro*, pois é considerada a mais adequada ao crescimento, diferenciação dos tecidos e absorção com maior rapidez (Ferreira et al., 2002; Skrebsky et al., 2004).

A propagação *in vitro* tradicional tem como premissa a presença de sacarose no meio de cultivo, uma vez que este composto eleva a produção de biomassa e pode contribuir para aumentar o enraizamento de muitas espécies *in vitro* (Grattapaglia e Machado, 1990; Walter, 2015). No entanto, o excesso de sacarose pode aumentar o grau de contaminação do meio de cultivo, promover alteração no estado hídrico, inibir a síntese de clorofila, diminuir as atividades de algumas enzimas do ciclo de Calvin e assim comprometer significativamente a capacidade fotoautotrófica (Kozai, 1996).

A sacarose se mostra de extrema importância na cultura de tecidos, pois é a fonte de carbono para o crescimento e desenvolvimento do explante, quando a taxa fotossintética nas condições *in vitro* não é otimizada. Este composto é indispensável, já que o sistema tradicional de cultivo não é suficientemente autotrófico (Barrueto Cid, 2001).

Os carboidratos fornecem energia metabólica e esqueletos carbônicos para a biossíntese de aminoácidos e proteínas e polissacarídeos estruturais como celulose (Torres et al., 1998). Entretanto, quando as fontes de carbono são adicionadas em altas concentrações, o potencial osmótico do meio pode acarretar estresse hídrico, com perdas de hidratação dos tecidos na condição *in vitro* (Souza, 1995).

Os estudos fisiológicos de fatores ambientais, ligados à atividade fotossintética de plantas em cultura de tecidos, são fundamentais para o processo de propagação *in vitro* bem como o acompanhamento do material vegetal até as condições *ex vitro*, após a utilização de pré-tratamentos *in vitro*. A utilização de

fatores ambientais como níveis de irradiâncias e compostos orgânicos como a sacarose foram estudados em *Ceratonia siliqua* L. Nesse trabalho, foi verificado que maiores valores de área foliar foram obtidos em combinações com menor concentração de sacarose e sob alta e baixa irradiância com maior concentração de sacarose (Vinterhalter et al., 2001).

Entretanto, os estudos com tabaco (*Nicotiana tabacum*) mostraram que os maiores valores de área foliar total foram encontrados nos pré-tratamentos com alta irradiância e alta concentração de sacarose no meio (Kadlecek et al., 2001). Neste trabalho, foi verificado um aumento de espessura foliar em condições elevadas de irradiância associadas à presença de sacarose. Segundo os autores, esses dois fatores foram os principais responsáveis pelo crescimento e desenvolvimento de plantas *in vitro* da espécie em estudo. Nesse caso, o controle do ambiente e do meio de cultura pode refletir a possibilidade de adequar as condições *in vitro*, com o objetivo de aproximá-lo ao máximo do ambiente *ex vitro*. Tal ação pode diminuir as perdas na aclimatização.

Em elevadas concentrações de sacarose, o crescimento de plantas de rosa teve forte impacto no teor de amido nas folhas e, posteriormente, na fotossíntese (Capellades et al., 1991). Neste trabalho, observou-se uma quantidade elevada de grânulos de amido nas plantas crescidas em meio com 5% de sacarose, enquanto que nos teores de 0 a 1%, nenhum grânulo foi observado. Paralelamente, o aumento na concentração da sacarose em níveis em torno de 5% reduziu, consideravelmente, a fotossíntese. Tal comprometimento na fotossíntese foi associado a alterações na emissão de fluorescência da clorofila (Capellades et al., 1990).

Após quatro dias de cultivo, plantas de orquídeas em condições fotoautotróficas apresentaram maior crescimento, maiores taxas de fotossíntese líquida e massa da matéria fresca e seca. O valor destas duas últimas variáveis foi 1,5 vezes superior ao das plantas cultivadas em condições fotomixotróficas (com sacarose no meio e sem ventilação forçada) (Hahn et al., 2001).

3.2.2.4. Intensidade luminosa

A luz é utilizada na sala de cultura como estímulo ao crescimento e ao desenvolvimento de plantas. A ação deste fator é devido à sua importância em

relação aos mecanismos da fotossíntese, da fotomorfogênese e do fototropismo (Genoud et al., 1999; Pyke e López-Juez, 1999). A luz branca fluorescente apresenta uma composição espectral que pode variar e, com isto, causar respostas diferenciadas na cultura *in vitro*. Como exemplo, em alguns casos, a predominância na emissão de fótons na região do vermelho até o azul pode estimular a indução de calos, quebrar a molécula de AIA (ácido indol acético) e ainda estimular a indução de brotos. Porém, nesta região do espectro, pode ter inibição na indução de raízes (Chamovitz e Deng, 1996; Barrueto Cid, 2001).

A exposição do material vegetal *in vitro* em intensidades luminosas combinadas com composições espectrais pode fazer parte de estudos em vários aspectos, como foi feito naqueles relacionados à proliferação de brotos em atemóia (Rasai et al., 1994), em maçã (Noé et al., 1997), em azaleias (Marks e Simpson, 1999) e em petúnia (Michalczuk e Michalczuk, 2000); no desenvolvimento de brotos em alfarraba (Vinterhalter et al., 2001) e em tabaco (Radochova et al., 2000; Kadlecsek et al., 2001).

Em geral, a intensidade da luz na faixa de 400 a 500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ melhora a atividade fotossintética (Hdider e Desjardins, 1994). Kozai et al. (1988, 1991), Lee et al. (1995) e Dubé e Vidaver (1992) mostraram que a elevação da intensidade luminosa, fornecida durante o cultivo *in vitro*, resultou no aumento na fotossíntese. Tendo as demais condições necessárias para se obter uma elevada atividade fotossintética, o aumento da intensidade luminosa pode melhorar o crescimento do explante. Entretanto, Lee et al. (1995) citam que, na presença de 314 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de fluxo de fótons fotossintéticos, as plantas tiveram menor saturação fotossintética do que as plantas crescidas sob intensidade de luz considerada média (115 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). A diminuição da fotossíntese foi atribuída a danos específicos nos pigmentos receptores de luz ligados ao sistema antena dos fotossistemas. Já Anna et al. (1999) citam que, sob um maior fluxo de fótons fotossintéticos (FFF) (70 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e, tanto em condições fotomixotrófica (sacarose 15 g L⁻¹) e fotoautotrófica, o crescimento de brotos de explantes de roseiras (cv. Samanta e Landora) cultivados *in vitro* foi superior quando comparado ao crescimento sob um menor FFF (35 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Uma interação significativa foi observada entre o DIF (diferença da temperatura média diurna com a média noturna) e o FFF, em cultivos de plantas de *Rehmannia glutinosa*, em condições fotoautotrófica e fotomixotrófica (Cui et al.,

2000). O maior crescimento das plantas foi em DIF positivo (+8 DIF; 18/25°C) e com o FFF de 210 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Outra concepção de fornecimento de energia luminosa no ambiente *in vitro* é o uso de luz natural. Em bananeira, Kodym e Arias (1999) utilizaram a luz natural numa intensidade média de 570 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de FFF, temperatura de 23-30°C e fotoperíodo de 12-16 h. Nestas condições, houve a maior produção de brotos comparativamente a plantas crescidas em luz artificial a 65 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, temperatura de 23-29°C e fotoperíodo de 16 h.

3.2.2.5. Trocas gasosas e membranas permeáveis a gases

Os explantes são normalmente cultivados *in vitro* em recipientes (frascos) fechados, que influenciam tanto a umidade relativa como as concentrações de CO_2 do microambiente (Smith e Spomer, 1995). Esse ambiente convencional *in vitro* é caracterizado pela alta umidade relativa do ar, baixa concentração de CO_2 e pelo acúmulo de etileno (Kozai et al., 1996; Hazarika, 2006; Xiao et al., 2011).

Nestes sistemas convencionais de propagação *in vitro* as trocas gasosas são realizadas pela ventilação que ocorre mediante a difusão de ar na área de contato entre a tampa e o frasco. Essa troca gasosa ocorre em função dos gradientes de pressão e temperatura entre o interior e o exterior do frasco, pelo gradiente de concentração de gases (O_2 , CO_2 , vapor de água, dentre outros) e pela velocidade e padrão de movimento do ar em torno do frasco (Xiao et al., 2011).

A concentração reduzida de CO_2 no frasco de cultura é parcialmente devido à baixa taxa de ventilação no sistema tradicional de cultura *in vitro*, limitando a disponibilidade de CO_2 em frascos pequenos. A baixa concentração desse gás inibe a atividade fotossintética das plantas *in vitro* e força o crescimento heterotrófico ou fotomixotrófico pela absorção do açúcar do meio de cultura como principal fonte de carbono (Nguyen e Kozai, 2005).

O uso de diferentes tipos de vedação dos frascos de cultura *in vitro* que permitam maior troca gasosa pode aumentar o crescimento dos explantes e a viabilização de sistemas de propagação fotoautotrófica. A modificação do microambiente do frasco de cultura promovida pelas trocas gasosas favorece a manutenção da concentração de CO_2 adequada para estimular a fotossíntese e reduz a concentração de etileno e a umidade relativa dentro dos frascos de cultivo (Kozai e Kubota, 2001).

No cultivo fotoautotrófico *in vitro*, uma forma de melhorar as trocas gasosas é o uso de membranas permeáveis a gases. Dessa forma, com o uso das membranas pode-se reduzir a umidade relativa do ar e aumentar a transpiração e a efetiva absorção de água e nutrientes pela planta (Xiao et al., 2011).

Portanto, o emprego de membranas permeáveis a gases é uma alternativa que pode melhorar as condições ambientais *in vitro*, proporcionando aumento nas trocas gasosas do ambiente com o interior dos frascos. Além disso, a eliminação ou redução da sacarose do meio de cultura também pode contribuir para a ativação e funcionamento do aparato fotossintético da planta. O cultivo fotoautotrófico possibilita resolver um dos problemas do cultivo *in vitro* convencional que é a transição brusca das plantas de uma condição heterotrófica ou mixotrófica *in vitro* para uma condição autotrófica durante a aclimatização (Saldanha et al., 2012).

Diferentes tipos de membrana têm sido disponibilizados comercialmente para proporcionar trocas gasosas em frascos de cultura *in vitro* de plantas, como: membranas MilliSeal® (MilliSeal, Nihon Millipore Ltda., Yonezawa, Japan), MilliWrap® (Millipore Corporation, USA), disco transparente de polipropileno (Courtaulds Films, Bridgewater, Somerset, UK), membranas de Teflon (Flora Laboratories; Austrália), Suncap® (Sigma, USA) e discos TQPL® (TQPL Supplies, UK) (Zobayed, 2005).

Diversas espécies já foram propagadas *in vitro* com sucesso usando membranas MilliSeal® para melhorar as trocas gasosas no frasco de cultura *in vitro*, dentre essas: *Azadirachta indica* (Rodrigues et al., 2011), *Aloe polyphylla* (Ivanova e Van Staden, 2010), *Solanum melongena* (Ribeiro et al., 2009), *Uniola paniculata* (Valero-Aracama et al., 2007), *Hypericum perforatum* (Couceiro et al., 2006), *Alhagi graecorum* (Zobayed et al., 2006), *Eucalyptus tereticornis* (Shavalli Khan et al., 2002). A utilização de membranas que aumentam as trocas gasosas entre o espaço interno do frasco de cultura e o ambiente pode também ser importante para a produção de metabólitos secundários *in vitro* (Tisserat et al., 2002; Srivastava e Srivastava, 2008; Tisserat et al., 2009; Rodrigues et al., 2011; Xiao et al., 2011).

No entanto, membranas MilliSeal® são de difícil obtenção no Brasil além do seu elevado custo. Assim, membranas microporosas preparadas artesanalmente são altamente viáveis, e podem ser usadas como alternativa para melhorar as trocas gasosas (Saldanha et al., 2012). Estas membranas são compostas por duas ou mais camadas de fita microporosa sendo que entre as camadas há uma camada

da fita veda rosca de politetrafluoretileno (PTFE). Em um trabalho com ginseng brasileiro não houve diferença entre os tratamentos com membranas MilliSeal® e com membranas caseiras. Os autores concluem que as membranas caseiras podem ser uma alternativa viável de baixo custo para o sistema fotoautotrófico (Saldanha et al., 2012).

O custo das membranas artesanais é de aproximadamente US\$ 0,082 nos EUA, enquanto a membrana comercial MilliSeal® custa US\$ 0,860, possibilitando a redução de custos. Além disso, as membranas caseiras são facilmente preparadas e utilizadas, o que evita problemas relacionados ao tempo de envio dos EUA ao Brasil (Saldanha et al., 2012).

3.2.3. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.3.1. Germoplasma

Foram utilizados como explantes sementes fisiologicamente maduras de pimentão *Capsicum annuum* comercial Topseed® (Casca dura 'Ikeda') lote 052931.

O experimento foi conduzido no Setor de Horticultura do Laboratório de Fitotecnia – LFIT, no Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias – CCTA da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF localizado no município de Campos dos Goytacazes (Latitude = 21°19'23", Longitude = 41°10'40"; Altitude = 14 m).

3.2.3.2. Desinfestação das sementes

As sementes foram desinfestadas por um minuto em álcool 70% (v/v), posteriormente imersas em 80 mL de solução de hipoclorito de sódio (NaClO) a 0,7% com adição de duas gotas de Tween 20 por 15 minutos e lavadas por três vezes em água deionizada e autoclavada nos tempos de 5, 10 e 10 minutos em fluxo laminar, respectivamente.

3.2.3.3. Condução do experimento

Após a desinfestação, as sementes foram inoculadas em frascos (65 x 125 mm), com 40 mL meio de cultura contendo metade da concentração dos sais minerais do MS, complexo vitamínico de White (Murashige e Skoog, 1962), 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, com pH ajustado para 5,7±0,1 e solidificado com 7 g L⁻¹ de ágar bacteriológico Vetec® antes da autoclavagem por 15 minutos a 121°C e 1,1 atm de pressão.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial 3x3x2, com três tipos de vedação dos frascos, três intensidades luminosas e duas concentrações de sacarose com oito repetições. Cada repetição foi constituída por um frasco com cinco explantes (Figura 14).

As vedações utilizadas foram (TR) tampa rígida de polipropileno, (PVC) filme PVC e (M2) tampa rígida com vedação utilizando filtros de membranas microporosas, composta por duas camadas de fita microporosa Missner®, sendo que entre as duas camadas foi colocada uma camada da fita veda rosca de PTFE (politetrafluoretileno) Amanco® (Figura 15) (Saldanha et al., 2012), neste tratamento foram perfurados dois orifícios de 10 mm de diâmetro onde foram colocadas as membranas.

As intensidades luminosas foram providas por lâmpadas fluorescentes OSRAM® luz do dia, fotoperíodo de 16:8 horas luz:escuro e irradiâncias de 65, 121 e 240 µmol m⁻² s⁻¹ de FFF. Foi utilizado um radiômetro para essa medição. As concentrações de sacarose utilizadas foram 20 e 0 g L⁻¹ adicionadas ao meio antes do processo de autoclavagem. Na sala de crescimento, a temperatura e a umidade relativa foram medidas pelo datalogger Kimo – Kistock KM 110® (Figura 16 A e B).

Vedação		Intensidade luminosa		Sacarose
Tampa Rígida	X	$65 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	X	0 g L^{-1}
Filme PVC		$121 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$		20 g L^{-1}
Membrana microporosa		$240 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$		

Figura 14. Infográfico do esquema fatorial do experimento com diferentes vedações, intensidades luminosas e concentrações de sacarose na germinação das sementes e crescimento *in vitro* de plantas de *Capsicum annuum*.

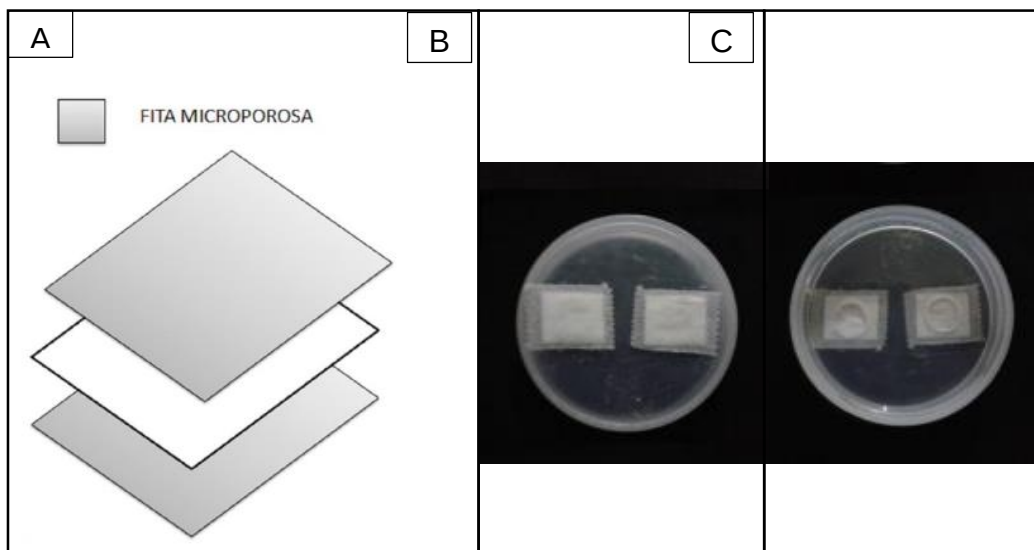


Figura 15. Modelo da confecção de membranas microporosas caseiras nas tampas dos frascos de cultivo. A) Membranas M2 com duas camadas de fita microporosa e uma de politetrafluoretileno. B) Vista superior da tampa com membrana caseira. C) Vista inferior da tampa com membrana caseira. Adaptado de Saldanha et al., (2012) (A) e Barbosa (2016) (B - C). Barra= 2 cm.

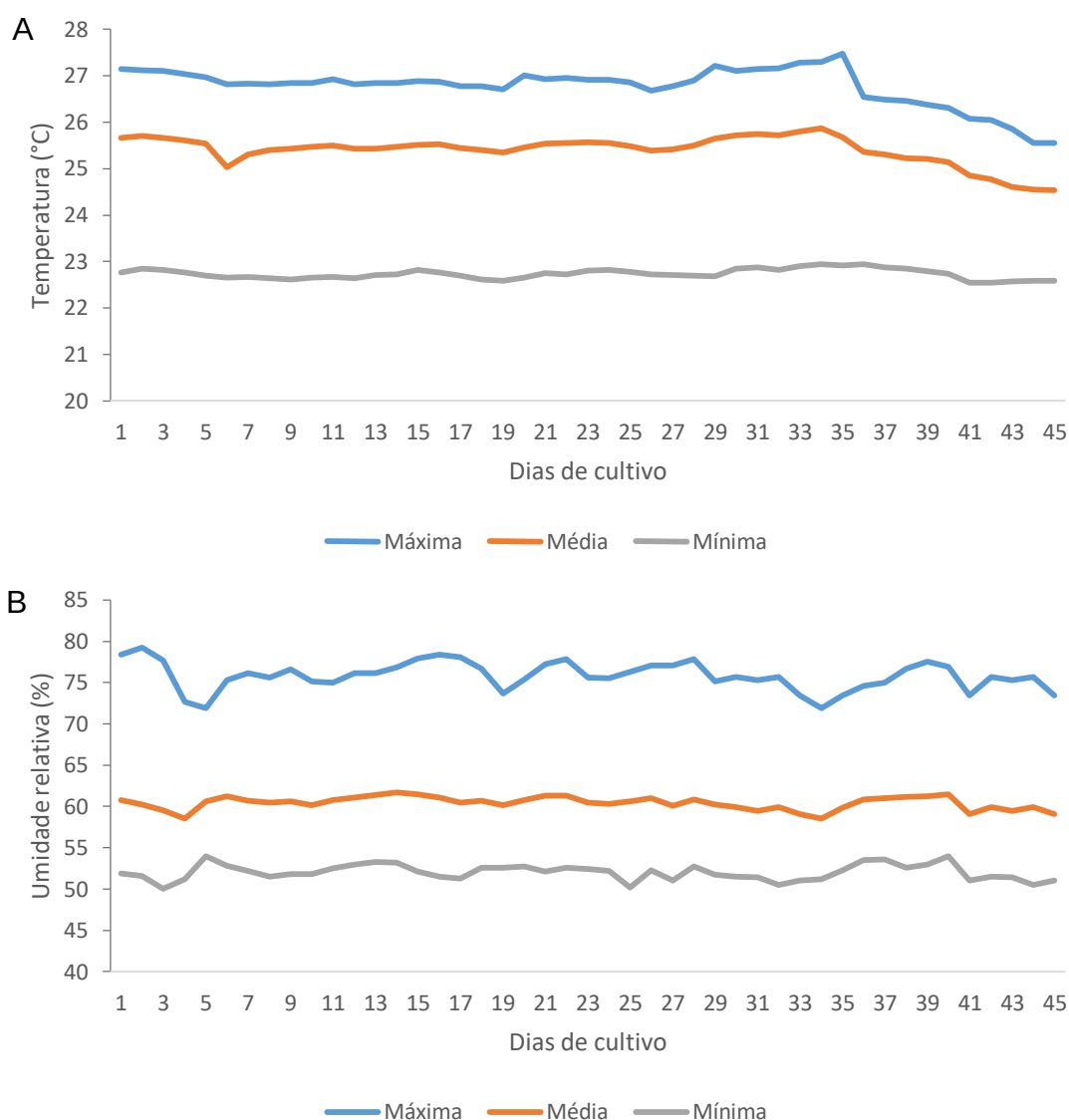


Figura 16. Gráficos das variáveis temperatura (A) e umidade relativa (B) da sala de crescimento durante os 45 dias de condução do experimento de germinação das sementes e crescimento *in vitro* de plantas de *Capsicum annuum*.

O experimento foi mantido em sala de cultivo por 45 dias. Ao final deste período 50% das plantas foram utilizadas para a avaliação da porcentagem de germinação, comprimento da parte aérea, volume de raiz, área foliar, número de folhas, massa da matéria seca da parte aérea, raiz e total.

A área foliar foi mensurada por meio do aparelho LI – 3100 (LICOR, Lincoln, NE, USA). A altura da parte aérea foi obtida por meio de um paquímetro digital. Para a massa da matéria seca, tanto a parte aérea como as raízes foram colocadas em envelopes de papel e secadas em estufa de ventilação forçada a 70°C por 72h

quando foi obtida massa constante. O volume radicular foi medido pelo deslocamento da água em uma proveta provocada pela introdução da raiz.

A capacidade fotossintética das plantas também foi avaliada. Foram feitas avaliações relacionadas à eficiência fotoquímica: Fv/Fm, PI e Intensidade de verde.

3.2.3.3.1. Rendimento quântico máximo do fotossistema II (Fv/Fm) e Índice Fotossintético — *Photosynthetic Index* (PI)

Para a avaliação da eficiência fotoquímica, o rendimento quântico máximo do fotossistema II (PSII) (Fv/Fm) e o Índice Fotossintético (PI) ($PI = RC/ABS \times F_v/F_0 \times ET/(TR-ET)$), foram determinados na terceira folha mais desenvolvida por meio de um fluorímetro não-modulado, modelo Pocket PEA Chlorophyll Fluorimeter (Hansatech Instruments – King's Lynn, Norfolk). Os frascos de cultivo nessa avaliação foram colocados 20 minutos no escuro, para a adaptação dos cloroplastos ao escuro, com finalidade de maior precisão dos centros de reações do fotossistema II (PSII). Para a leitura o equipamento incidiu um feixe de luz de $3500 \mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ com assistência de três diodos emissores de luz com comprimento de 650 nm.

3.2.3.3.2. Intensidade de verde

A estimativa de intensidade da cor verde foi avaliada nas plantas por meio do medidor portátil de clorofila SPAD-502 *Chlorophyll Meter* (Minolta, Japão). Foram feitas três leituras em cada folha amostrada. As maiores folhas foram escolhidas para a realização das medições.

3.2.3.3. Análises estatísticas

As variáveis foram submetidas a testes iniciais de homogeneidade e normalidade. Os dados de germinação, volume radicular, área foliar, massa da matéria seca da parte aérea, raiz e total, Fv/Fm e PI foram transformados por raiz quadrada ($y = \sqrt{x+0,5}$). Em seguida, foi realizada a análise de variância e os graus de liberdade dos tratamentos e suas interações foram desdobradas pelo teste

Tukey a 5% de probabilidade com o auxílio do programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2011).

3.2.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.2.4.1. Germinação e crescimento *in vitro*

Com a análise de variância foi possível verificar que houve diferenças estatísticas em todas as variáveis. No entanto, apenas para comprimento da parte aérea e germinação não houve interação significativa entre as fontes de variação (Tabela 4).

A sacarose foi o único fator que influenciou na germinação das sementes de *C. annuum* (Tabela 4). Sementes colocadas em meio de cultura sem sacarose obtiveram maior germinação (89%) quando comparadas as crescidas sem sacarose no meio de cultura (Figura 17). A sacarose interferiu negativamente no processo germinativo das sementes de *C. annuum*.

A diminuição da porcentagem de germinação com aumento na concentração de sacarose tem sido relatada por outros pesquisadores, devido a mudanças no potencial osmótico do meio de cultura causado pela sacarose (Reis et al., 2008). Concentrações elevadas de sacarose fazem com que o meio de cultura disponibilize menor quantidade de água para o embrião, dificultando o processo de germinação (George, 2008). Embora não haja muitos relatos para *Capsicum*, o trabalho de Walter (2015) com *C. annuum*, *C. frutescens*, *C. chinense* e *C. baccatum* evidenciou que na ausência de sacarose a porcentagem de germinação foi mais eficiente do que em meio com sacarose. Pinheiro et al. (2001) trabalharam com *Hancornia speciosa* e também descobriram que na ausência e na presença de 10 g L⁻¹ de sacarose, a porcentagem de germinação foi maior, e maiores concentrações proporcionaram uma diminuição na porcentagem de germinação.

A sacarose não é necessária para a germinação *in vitro* de embriões cotiledonares de *C. frutescens* e *C. baccatum*. Em *C. frutescens* a germinação foi menor quando acrescentaram sacarose ao meio de cultura (Walter et al., 2018). O

mesmo foi observado na germinação *in vitro* de sementes de *C. frutescens* por Walter (2015).

Tabela 4. Resumo da análise de variância com quadrados médios para os efeitos da Intensidade Luminosa (IL), Sacarose (Sac) e Vedação (Ved) e suas interações na eficiência da germinação e crescimento *in vitro* de sementes de *Capsicum annuum*. Campos dos Goytacazes, RJ, 2019.

FV	GL	QM ^a					
		Germ	CPA	VR	NF	AF	MSPA
Intensidade Luminosa (IL)	2	0,28 ^{ns}	475,92*	0,02*	0,52 ^{ns}	0,87*	0,00 ^{ns}
Sacarose (Sac)	1	2,86*	598,77*	0,08*	23,43*	6,65*	0,07*
Vedação (Ved)	2	0,17 ^{ns}	1548,15*	0,04*	50,03*	40,72*	0,10*
IL x Sac	2	1,02 ^{ns}	34,45 ^{ns}	0,00 ^{ns}	2,16*	0,66*	0,00 ^{ns}
IL x Ved	4	0,96 ^{ns}	34,94 ^{ns}	0,02*	0,66 ^{ns}	0,47*	0,00*
Sac x Ved	2	0,85 ^{ns}	22,14 ^{ns}	0,01 ^{ns}	6,20*	0,98*	0,00*
IL x Sac x Ved	4	0,91 ^{ns}	15,57 ^{ns}	0,01 ^{ns}	0,03 ^{ns}	0,19 ^{ns}	0,00 ^{ns}
Erro	53	0,69	21,53	0,01	0,46	0,10	0,00
C.V. (%)		19,51	16,14	6,95	12,14	10,43	18,72
FV	GL	QM					
		MSR	MST	SPAD	FV/FM	PI	
Intensidade Luminosa (IL)	2	0,00 ^{ns}	0,01*	273,29*	0,01*	0,66*	
Sacarose (Sac)	1	0,02*	0,07*	174,50*	0,01*	0,00 ^{ns}	
Vedação (Ved)	2	0,03*	0,13*	682,45*	0,02*	5,28*	
IL x Sac	2	0,02*	0,00 ^{ns}	101,48*	0,00 ^{ns}	0,15 ^{ns}	
IL x Ved	4	0,01*	0,00*	118,10*	0,00 ^{ns}	0,06 ^{ns}	
Sac x Ved	2	0,00*	0,00 ^{ns}	81,99 ^{ns}	0,01*	0,79*	
IL x Sac x Ved	4	0,00 ^{ns}	0,00 ^{ns}	14,16 ^{ns}	0,00 ^{ns}	0,01 ^{ns}	
Erro	53	0,00	0,00	27,34	0,00	0,05	
C.V. (%)		15,94	12,17	16,35	2,56	15,43	

^a ^{ns} e * indicam não significância ou significância em $P \leq 0,05$. Legenda: Germ: Germinação; CPA: Comprimento da parte aérea. VR: Volume radicular; NF: Número de folhas; AF: Área foliar; MSPA, MSR e MST: Massa da matéria seca da parte aérea, raiz e total; PI: Índice fotossintético.

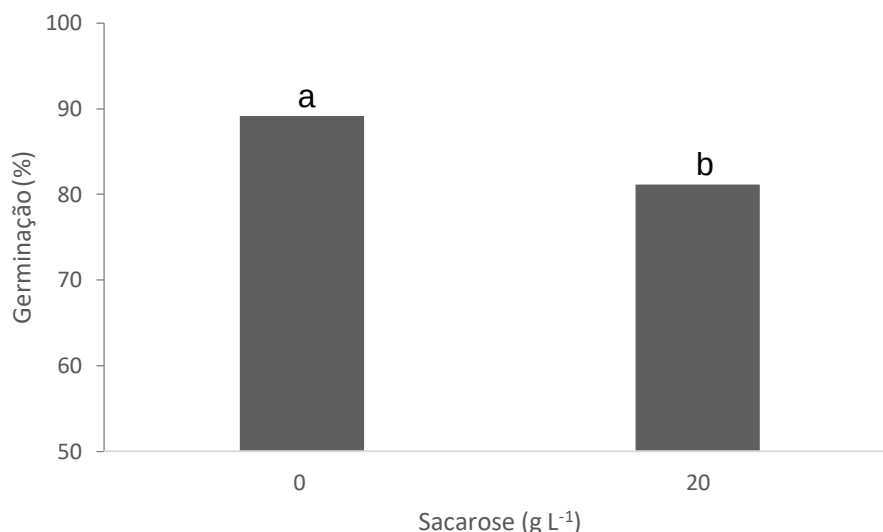


Figura 17. Germinação (%) *in vitro* de sementes de *Capsicum annuum* cultivadas *in vitro* por 45 dias na ausência e com 20 g L⁻¹ de sacarose. Colunas seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste F ($p \leq 0,05$).

Em relação ao comprimento da parte aérea é possível verificar o efeito isolado de cada fonte de variação (sacarose, intensidade luminosa e tipo de vedação) (Tabela 4). As plantas apresentaram maior crescimento no meio com sacarose (Figura 19D, E, F, J, K, L, P, Q, R), apresentando um comprimento da parte aérea superior quando comparado com plantas germinadas em meios com ausência de sacarose (Figura 19A, B, C, G, H, I, M, N, O) (Figura 18A). A utilização de sacarose no meio de cultura fornece energia para o metabolismo vegetal *in vitro* promovendo assim um maior desenvolvimento do vegetal quando comparado com plantas cultivadas em meio na ausência da mesma (Hazarika, 2003).

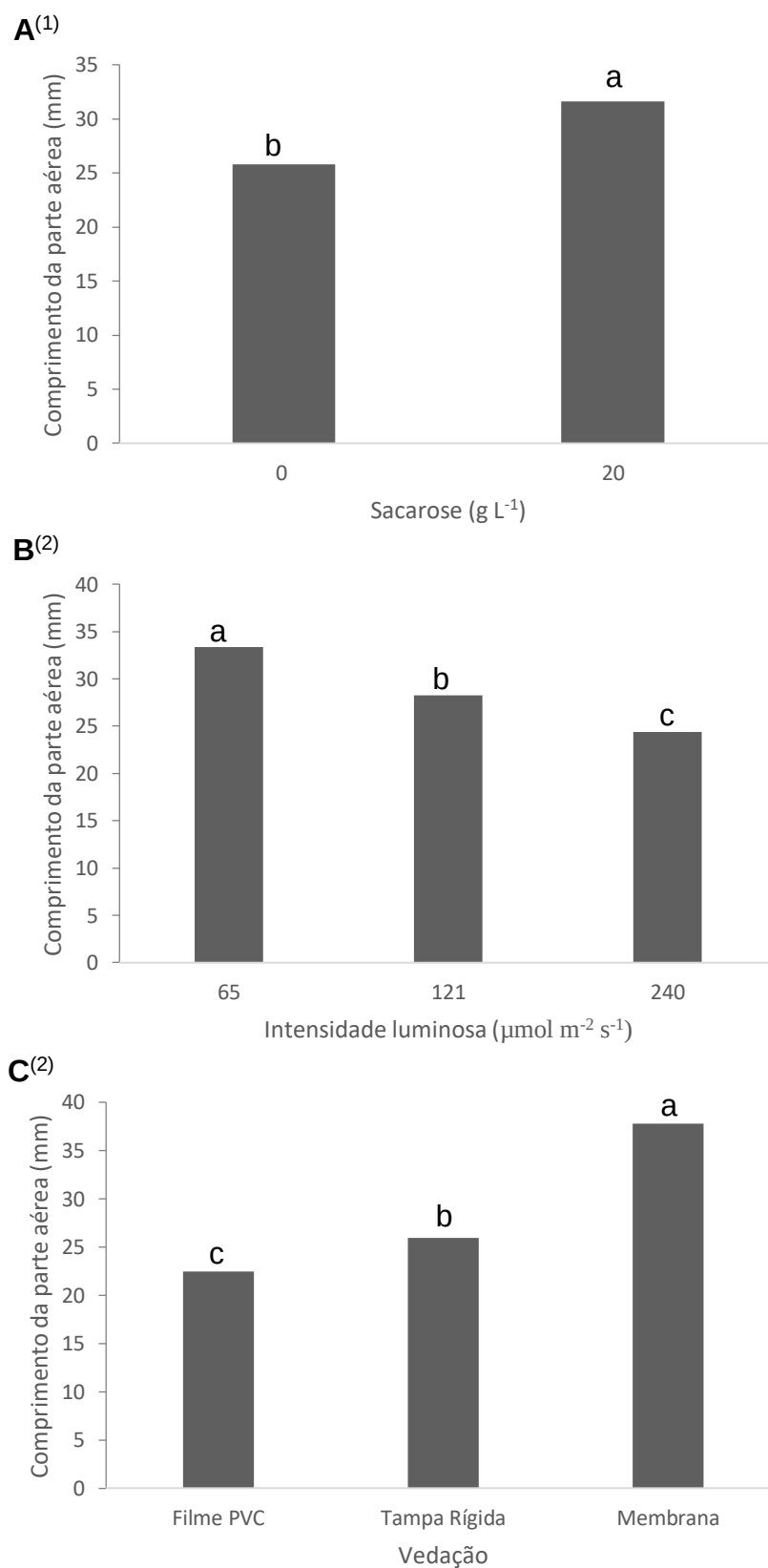


Figura 18. Comprimento da parte aérea de plantas de *Capsicum annuum* após 45 dias de cultivo *in vitro*. Efeito de: A) Sacarose; B) Intensidade luminosa; C) Tipo de vedação. Colunas seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste ⁽¹⁾ F ou ⁽²⁾ Tukey ($p \leq 0,05$).

Quanto maior a intensidade luminosa menor o comprimento das plantas de *C. annuum* (Figura 18B). Provavelmente as plantas em menor intensidade estiolaram, buscando maior intensidade luminosa. Este maior comprimento das plantas nas menores intensidades pode ser o resultado do processo de estiolamento induzido pela intensidade luminosa deficiente, ocasionando um maior crescimento dos entrenós com caules mais finos. Resultados similares também foram obtidos por Radmann et al. (2001) para *Gypsophila paniculata*.

Com relação ao sistema de vedação, observa-se que o filme PVC proporcionou os menores comprimentos de parte aérea (Figura 19A, D, G, J, M, P), seguido da tampa rígida de polipropileno (Figura 19B, E, H, K, N, Q). O melhor resultado foi obtido com o uso de membranas permeáveis (Figura 19C, F, I, L, O, R), uma vez que proporcionaram maiores trocas gasosas (Figura 18C). A vedação dos frascos limita as trocas gasosas com o ambiente, causando problemas em algumas espécies durante o cultivo *in vitro* (Nguyen e Kozai, 2005; Alvarez et al., 2012). Uma maior ventilação dos frascos de cultura pode reduzir a umidade relativa no cultivo *in vitro* e também aumentar a taxa de transpiração, o que favorece um microambiente adequado para o crescimento da planta (Zobayed et al., 1999; Xiao et al., 2011).

Numerosos estudos mostram o aumento do crescimento das plantas ao usar membranas permeáveis a gases: Kozai et al. (1988) em batata (*Solanum tuberosum*), Kozai e Iwanami (1988) em cravo (*Syzygium aromaticum*), Nguyen e Kozai (1998) em bananeira (*Musa* spp.), Xiao et al. (2003) em cana de açúcar (*Saccharum* spp.), Lucchesini et al. (2006) em murta (*Myrtus communis* L.), Liao et al. (2007) em gérbera (*Gerbera jamesonii* L.), Xiao e Kozai (2006) em *Limonium latifolium* L., Zhang et al. (2009) em *Momordica grosvenori* L., Iarema et al. (2012) e Saldanha et al. (2012) em ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata* (Spreng), Pinheiro et al. (2013) em oliveira (*Olea europaea* L.) e Batista (2012) em pimentão ornamental (*Capsicum annuum*).

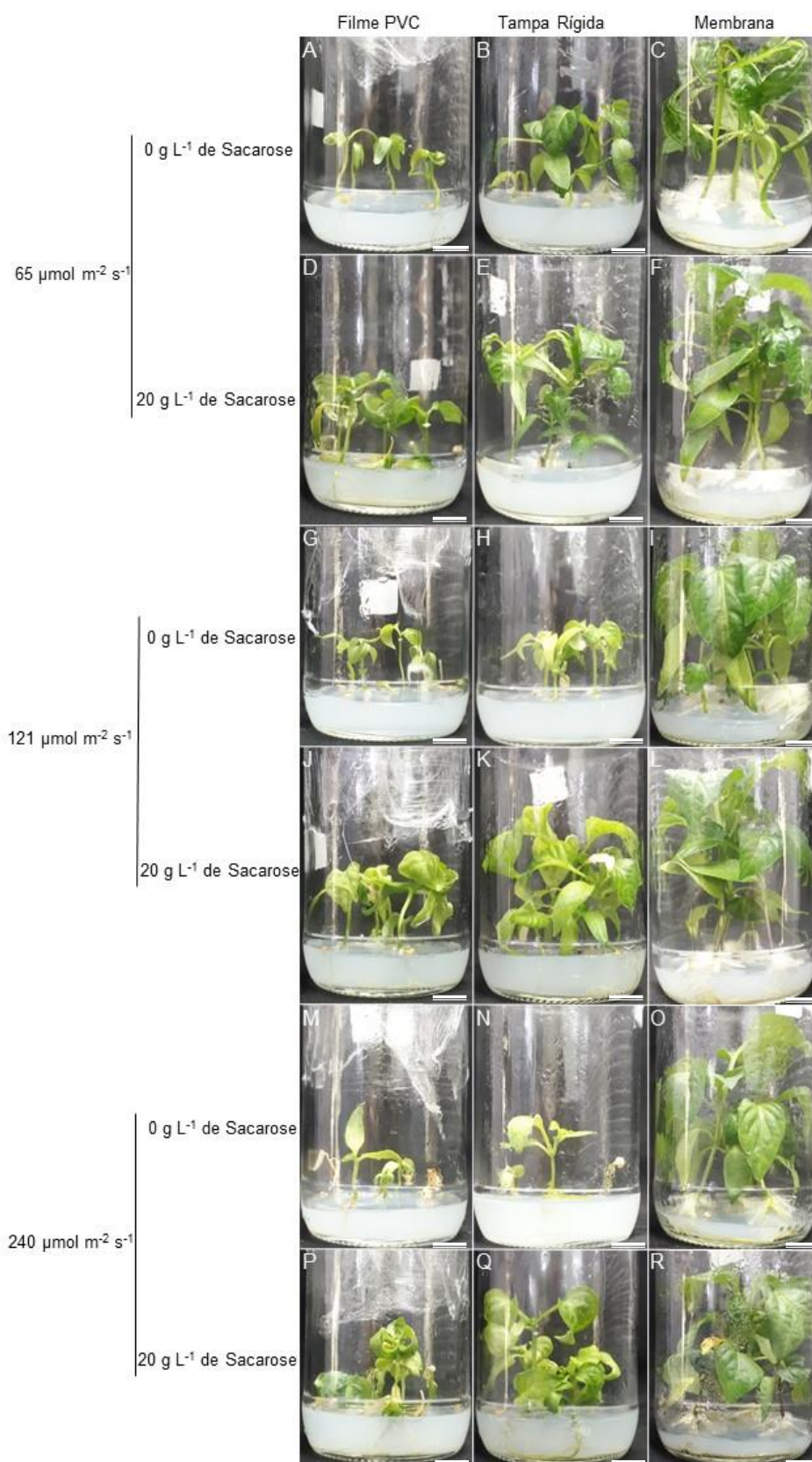


Figura 19. Aspecto geral de plantas de *Capsicum annuum* após 45 dias de cultivo *in vitro* em diferentes concentrações de sacarose, intensidades luminosas e tipo de vedações. Barra= 1cm.

A sacarose, a intensidade luminosa e a vedação afetaram o volume radicular das plantas *in vitro*. No entanto, houve a interação significativa entre intensidade luminosa e tipo de vedação (Tabela 4). Assim como para o comprimento da parte aérea, a presença de sacarose no meio de cultura proporcionou maior volume radicular (Figura 20) (Figura 21D, E, F, J, K, L, P, Q, R). O uso de uma fonte exógena de carbono no meio de cultura proporciona maior acúmulo de biomassa e crescimento do explante ao fornecer energia metabólica e esqueletos carbônicos para a biossíntese de aminoácidos e proteínas e polissacarídeos estruturais (Torres et al., 1998).

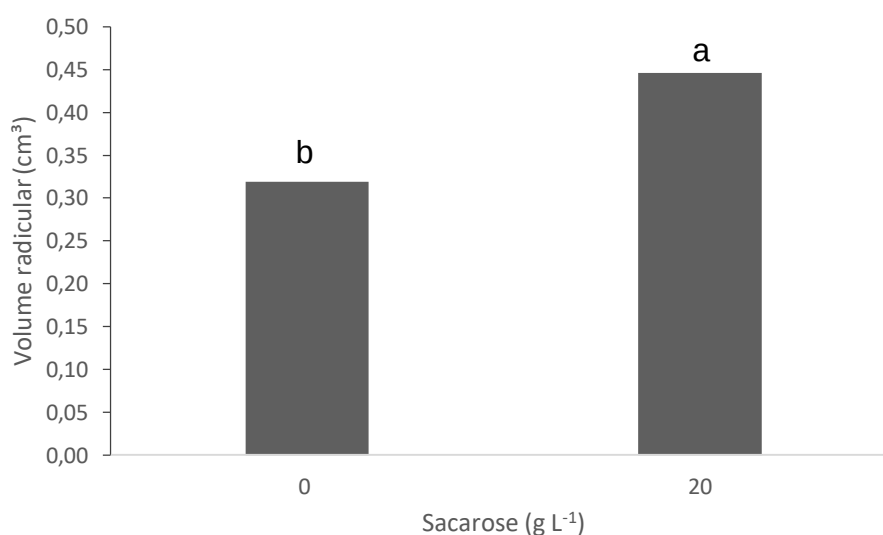


Figura 20. Volume radicular de plantas de *Capsicum annuum* germinadas e desenvolvidas *in vitro* em diferentes concentrações de sacarose após 45 dias. Colunas seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste F ($p \leq 0,05$).

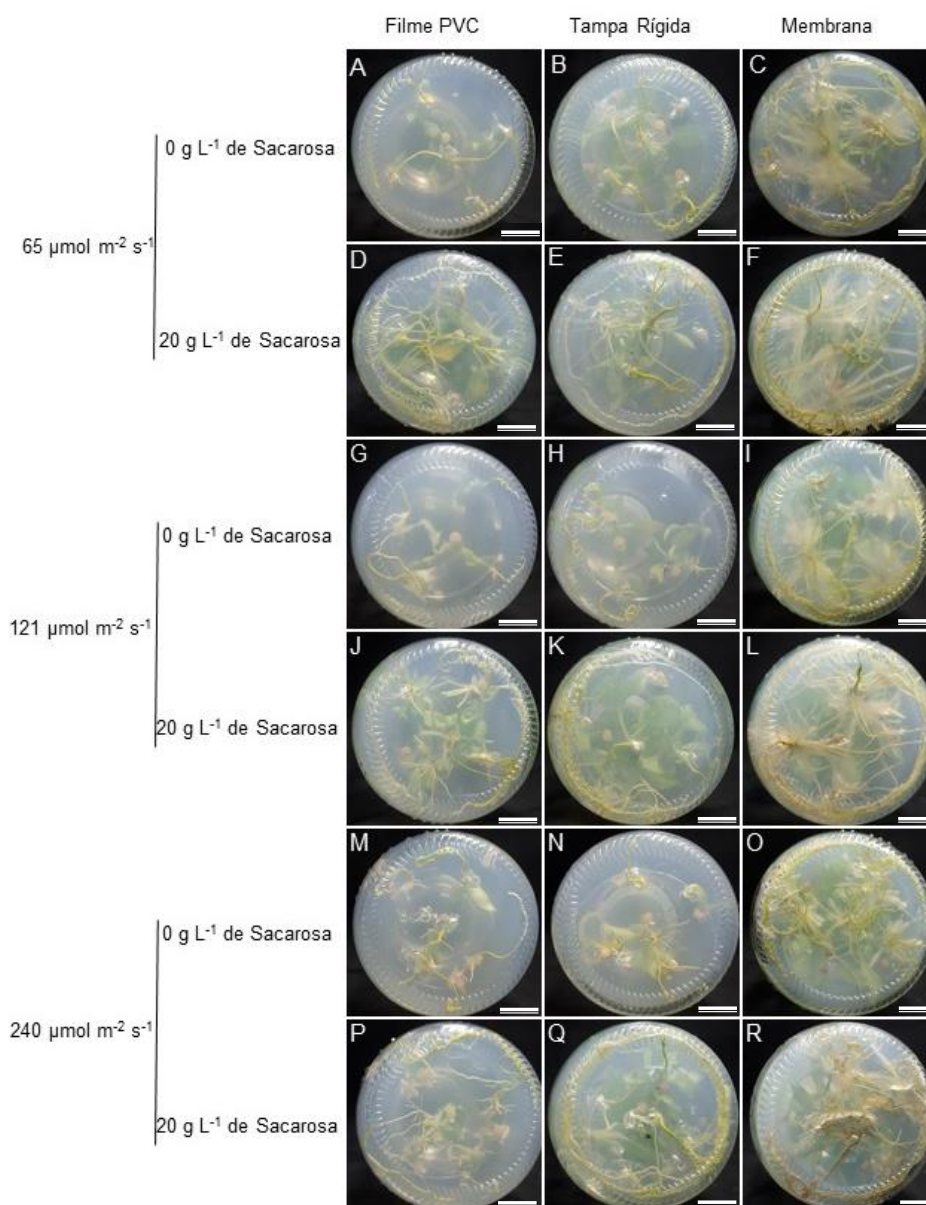


Figura 21. Aspecto geral das raízes de *Capsicum annuum* cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações de sacarose, intensidades luminosas e tipo de vedações. Barra= 1cm.

Plantas cultivadas em 65 e 121 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ independente do tipo de vedação não diferiram entre si para o volume radicular (Tabela 5). Ou seja, nestas intensidades o tipo da vedação não influenciou no crescimento radicular. Resultados similares foram obtidos por Magalhães Junior e Peters (1991) que, fornecendo diferentes intensidades de luz em brotos de ameixeira cultivados *in vitro*, não observaram diferenças significativas no enraizamento. Radmann et al. (2001) também afirmam que, para *Gypsophila paniculata*, as intensidades luminosas utilizadas na fase de multiplicação não afetaram o posterior

enraizamento dos brotos. Leite et al. (2000), contudo, relatam que uma maior intensidade luminosa teve efeitos significativos no número de raízes emitidas por brotação, no aumento de 25%.

No entanto, as plantas mantidas em $240 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de FFF vedadas com tampas com membranas permeáveis obtiveram um volume radicular superior aos demais (Tabela 5) (Figura 21O, R), evidenciando o efeito do aumento das trocas gasosas associado a uma alta intensidade luminosa. Para apresentar bons resultados de crescimento e desenvolvimento, não basta apenas aumentar a densidade de FFF, mas sim permitir que os recipientes de cultivo *in vitro* permitam maior troca gasosa. Como a troca gasosa do ambiente para o interior do frasco é bastante reduzida no cultivo convencional, à oscilação na taxa fotossintética é devida ao CO_2 (Park et al., 2011).

Tabela 5. Análise de desdobramento do volume radicular de plantas de *Capsicum annuum* em função da interação entre a concentração de sacarose e o tipo de vedação após 45 dias de cultivo *in vitro*. Campos dos Goytacazes, 2019.

Vedação	Volume radicular (cm^3)		
	Intensidade luminosa ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)		
	65	121	240
Filme PVC	0,38 aA	0,28 aA	0,32 bA
Tampa Rígida	0,35 aA	0,36 aA	0,35 bA
Membrana	0,35 aB	0,41 aB	0,66 aA
C.V. (%)	6,95		

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$).

Para o número de folhas houve efeito significativo para a sacarose e tipo de vedação, assim como para a interação entre intensidade luminosa e vedação e entre intensidade luminosa e sacarose (Tabela 4). Plantas cultivadas em meios sem sacarose e baixas intensidades luminosas (65 e $121 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) apresentaram menor quantidade de folhas, 4,65 e 5,03 folhas por planta, respectivamente. No entanto quando colocadas em uma intensidade maior ($240 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) as plantas produziram mais folhas (Tabela 6). Observa-se ainda que se colocarmos em meio

com sacarose (20 g L^{-1}) não há diferenças no número de folhas. O déficit causado pela baixa intensidade luminosa é corrigido com o incremento da fonte de carbono ao meio de cultura.

Tabela 6. Análise de desdobramento do número de folhas de plantas de *Capsicum annuum* em função da interação entre a Intensidade luminosa e a concentração de sacarose após 45 dias de cultivo *in vitro*. Campos dos Goytacazes, 2019.

Intensidade luminosa ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	Sacarose (g L^{-1})	
	0	20
65	4,65 bB	6,22 aA
121	5,03 abB	6,43 aA
240	5,38 aA	5,82 aA
C.V. (%)	12,14	

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste F e Tukey ($P \leq 0,05$), respectivamente.

A ausência de sacarose com o uso de filme PVC para a vedação prejudicou o desenvolvimento e formação de folhas (Tabela 7) (Figura 19A, G, M). O mesmo é observado quando usado a tampa rígida de polipropileno. Com estes dois tipos de vedação o uso da sacarose proporcionou um aumento significativo no número de folhas. Estes fatos não são observados quando são utilizadas tampas com membranas permeáveis. Tanto com sacarose quanto na ausência, as plantas produziram o mesmo número de folhas (Tabela 7).

A área foliar foi influenciada tanto pelos fatores vedação e intensidade luminosa como pelo fator sacarose, havendo significância nas interações entre os mesmos (Tabela 4). Maiores áreas foliares foram encontradas na vedação com membrana independente da intensidade luminosa utilizada (Tabela 8). No entanto, maiores intensidades luminosas (121 e $240 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) proporcionaram maiores áreas foliares, não havendo diferenças estatísticas entre elas. Plantas cultivadas em tampas rígidas com 121 e $240 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ de FFF apresentaram resultados medianos sem significância entre elas e com a intensidade de $65 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, já

as plantas cultivadas com vedação de filme PVC tiveram áreas foliares inferiores (Tabela 8).

Tabela 7. Análise de desdobramento do número de folhas de plantas de *Capsicum annuum* em função da interação entre a concentração de sacarose e o tipo de vedação após 45 dias de cultivo *in vitro*. Campos dos Goytacazes, 2019.

Vedação	Sacarose (g L ⁻¹)	
	0	20
Filme PVC	3,33 cB	5,54 bA
Tampa Rígida	4,57 bB	5,60 bA
Membrana	7,08 aA	7,33 aA
C.V. (%)	12,14	

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste F e Tukey ($P \leq 0,05$), respectivamente.

Tabela 8. Análise de desdobramento da área foliar de plantas de *Capsicum annuum* em função da interação entre a intensidade luminosa e o tipo de vedação após 45 dias de cultivo *in vitro*. Campos dos Goytacazes, 2019.

Vedação	Área foliar (cm ²)		
	Intensidade luminosa ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)		
	65	121	240
Filme PVC	4,27 bA	4,49 cA	3,14 cA
Tampa Rígida	5,43 bA	6,73 bA	6,47 bA
Membrana	16,18 aB	23,06 aA	21,28 aA
C.V. (%)	10,43		

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$).

Em relação ao uso de sacarose em análise conjunta a intensidade luminosa, é possível verificar que na ausência de sacarose no meio de cultura as intensidades de 121 e 240 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ apresentaram as maiores áreas foliares. Apenas na intensidade de 240 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ não houve diferenças significativas entre a ausência e a presença de sacarose no meio de cultura. Nos demais a sacarose no meio de cultura proporcionou aumento de área (Tabela 9). Assim verifica-se que a formação de grande área foliar foi possível em cultivo na ausência de sacarose, no

entanto esta condição necessita de intensidades mais elevadas do que comumente é utilizada tradicionalmente na cultura de tecidos, em torno de 25 a 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Quando se analisou a concentração de sacarose e o tipo de vedação observa-se maior área foliar com o uso de tampas com membranas permeáveis a gás, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos. Estes foram os únicos que não diferiram significativamente entre si em relação à ausência ou presença de sacarose (Tabela 10). A vedação com membranas permeáveis provavelmente favoreceu o desenvolvimento dos aparatos fotossintéticos das plantas devido as maiores disponibilidades de CO_2 além da redução da umidade do microambiente *in vitro* proporcionando assim maior crescimento das plantas.

Tabela 9. Análise de desdobramento da área foliar de plantas de *Capsicum annuum* em função da interação entre a intensidade luminosa e a concentração de sacarose após 45 dias de cultivo *in vitro*. Campos dos Goytacazes, 2019.

Intensidade luminosa ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Área foliar (cm^2)	
	Sacarose (g L^{-1})	
	0	20
65	5,96 bB	11,30 abA
121	9,99 aB	12,86 aA
240	10,25 aA	10,66 bA

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste F e Tukey ($P \leq 0,05$), respectivamente.

Tabela 10. Análise de desdobramento da área foliar de plantas de *Capsicum annuum* em função da interação entre a concentração de sacarose e o tipo de vedação após 45 dias de cultivo *in vitro*. Campos dos Goytacazes, 2019.

Vedação	Área foliar (cm^2)	
	Sacarose (g L^{-1})	
	0	20
Filme PVC	2,07 cB	5,87 cA
Tampa Rígida	4,21 bB	8,03 bA
Membrana	19,43 aA	20,92 aA
C.V. (%)	10,43	

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste F e Tukey ($P \leq 0,05$), respectivamente.

A variável área foliar está correlacionada à fotossíntese, em que quanto maior a área foliar maior a quantidade de CO₂ que passará para o mesófilo foliar, por meio dos estômatos. Ou seja, quanto maior a área foliar maior a taxa fotossintética (Hazarika, 2006; Park et al., 2011).

Mohamed e Alsadon (2011) trabalhando com *C. annuum* e o cultivo *in vitro* em frascos com ventilação forçada de CO₂ corroboram com os resultados obtidos na presente pesquisa. Neste trabalho, as plantas em frascos com ventilação apresentaram maiores áreas foliares em comparação aos sem ventilação. Outros trabalhos semelhantes foram os de Saldanha et al. (2012) e Iarema et al. (2012), trabalhando com membranas microporosas em plantas de ginseng *in vitro*. Estes autores observaram que plantas em frascos com membranas apresentaram maior área foliar quando comparadas com plantas em frascos sem membranas.

Trabalhos mostram que fornecendo condições fotoautótrofas para as plantas, como o aumento da concentração de CO₂, aumento da intensidade luminosa e a eliminação total da sacarose no meio de cultura, podem promover maior fotossíntese e acúmulo de biomassa vegetal (Shin et al., 2013).

As maiores intensidades luminosas e trocas gasosas do ambiente *in vitro* favorecem a taxa fotossintética líquida, transpiração, aumento na condutância estomática, dentre outros. O que pode, conseqüentemente, ter proporcionado maior crescimento das plantas de *C. annuum* cultivadas nestas condições (Dewir et al., 2005; López et al., 2015). Resultado este que fica evidente quando se observa no presente trabalho, que frascos com filme PVC promoveram os menores valores de área foliar (Tabela 10). Uma vez que este tipo de vedação restringe as trocas gasosas do ambiente interno dos frascos com o externo, não permitindo que o CO₂ atmosférico entre frequentemente para o interior dos frascos, causando oscilação nas taxas fotossintéticas e reduzida área foliar. O uso de membranas nos frascos sem ou com pouca sacarose no meio de cultivo, aumenta significativamente a área foliar de plantas de pimentão.

Tanto para a massa da matéria seca da parte aérea quanto para massa da matéria seca da raiz e total, houve interação entre a intensidade luminosa e o tipo de vedação (Tabela 4). De forma geral, observa-se que o uso da membrana permeável proporcionou maior incremento de biomassa, sendo significativamente diferente dos demais tipos de vedação para todas as variáveis. As intensidades luminosas de 121 e 240 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de FFF também contribuíram para uma maior

massa da matéria seca tanto da parte aérea quanto da raiz e consequentemente do total. No entanto, para a MSR a intensidade mediana ($121 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) foi a que apresentou o maior acúmulo de biomassa, sendo esta mais eficiente para o crescimento das raízes (Tabela 11).

Elevadas densidades de FFF (121 e $240 \mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) em frascos que não permitem alta troca gasosa não foram eficientes no cultivo *in vitro* de plantas de *C. annuum* (Tabela 11). As plantas apresentaram crescimento reduzido de parte aérea (Figura 19G, H, J, K, M, N, P, Q) e raízes (Figura 21G, H, J, K, M, N, P, Q) comparados com plantas cultivadas em frascos com membranas permeáveis (Figura 19I, L, O, R; Figura 6 I, L, O, R). Ou seja, além de aumentar a densidade de FFF é preciso permitir que haja maior entrada de CO_2 no interior do recipiente de cultivo (López et al., 2015; Barbosa, 2016).

O uso de membranas permeáveis para aumentar as trocas gasosas com meio de cultura acrescido de sacarose proporcionaram as maiores MSPA e MSR. Plantas em meio de cultura sem sacarose apresentaram resultados interiores a combinação com uso de membrana e 20 g L^{-1} de sacarose, no entanto este tratamento ainda obteve um alto acúmulo de biomassa, principalmente quando se compara com frascos vedados com tampa rígida e filme PVC. Para MSPA o uso da sacarose permitiu maior biomassa independente da vedação (Tabela 12), o que já era esperado de certa forma, pois a sacarose é uma fonte de carbono que tem a finalidade de fornecer energia para o metabolismo vegetal *in vitro* (Hazarika, 2003).

Tabela 11. Massa da matéria seca da parte aérea (MSPA), massa da matéria seca da raiz (MSR) e massa da matéria seca total (MST) de plantas de *Capsicum annuum* em função da interação entre a intensidade luminosa e o tipo de vedação após 45 dias de cultivo *in vitro*. Campos dos Goytacazes, 2019.

Massa da matéria seca da parte aérea (mg)			
Vedação	Intensidade luminosa (μmol m ⁻² s ⁻¹)		
	65	121	240
Filme PVC	17,60 bA	11,85 cB	13,26 bAB
Tampa Rígida	14,33 bA	18,10 bA	19,52 bA
Membrana	39,92 aB	56,72 aAB	63,01 aA
C.V. (%)	18,72		
Massa da matéria seca da raiz (mg)			
Vedação	Intensidade luminosa (μmol m ⁻² s ⁻¹)		
	65	121	240
Filme PVC	4,83 cB	4,84 bB	6,84 bA
Tampa Rígida	6,62 bA	5,69 bB	6,37 bA
Membrana	18,54 aB	25,38 aA	18,77 aB
C.V. (%)	15,94		
Massa da matéria seca total (mg)			
Vedação	Intensidade luminosa (μmol m ⁻² s ⁻¹)		
	65	121	240
Filme PVC	22,43 bA	16,69 bA	20,10 bA
Tampa Rígida	20,95 bA	23,79 bA	25,89 bA
Membrana	58,47 aB	82,10 aA	81,78 aA
C.V. (%)	12,17		

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$).

O acúmulo de massa da matéria seca na parte aérea está relacionado com o aumento das taxas fotossintéticas. Frascos ventilados possibilitam maiores trocas gasosas e desta forma, aumento das taxas fotossintéticas, e consequentemente maior produção de fotoassimilados, o que contribui para o acúmulo de biomassa vegetal (Kozai, 1991; Xiao et al., 2011). O aumento das trocas gasosas possibilita maior crescimento *in vitro* (Couceiro et al., 2006; Ribeiro et al., 2009; Barbosa, 2016).

Tabela 12. Análise de desdobramento das variáveis de massa da matéria seca da parte aérea (MSPA) e massa da matéria seca da raiz (MSR) de plantas de *Capsicum annuum* em função da interação entre a concentração de sacarose e o tipo de vedação após 45 dias de cultivo *in vitro*. Campos dos Goytacazes, 2019.

Massa da matéria seca da parte aérea (mg)		
Vedação	Sacarose (g L ⁻¹)	
	0	20
Filme PVC	5,62 cB	22,85 bA
Tampa Rígida	10,76 bB	23,14 bA
Membrana	41,18 aB	65,26 aA
C.V. (%)	18,72	

Massa da matéria seca da raiz (mg)		
Vedação	Sacarose (g L ⁻¹)	
	0	20
Filme PVC	4,71 bA	6,30 cA
Tampa Rígida	4,85 bB	7,48 bA
Membrana	13,71 aB	28,09 aA
C.V. (%)	15,94	

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste F e Tukey ($P \leq 0,05$), respectivamente.

A sacarose em interação com a intensidade luminosa exerceu influência na MSR (Tabela 4). Como já verificado para outras variáveis, a sacarose proporcionou maior acúmulo de biomassa nas raízes, exceto na intensidade de $65 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. A combinação do uso de sacarose (20 g L^{-1}) e das intensidades de 121 e $240 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ possibilitaram os maiores acúmulos de biomassa. Já na ausência de sacarose não houve diferença entre as intensidades. Ou seja, a intensidade luminosa não influencia no acúmulo de biomassa radicular em *C. annuum* quando cultivados em meio sem sacarose (Tabela 13).

Tabela 13. Análise de desdobramento da área foliar de plantas de *Capsicum annuum* em função da interação entre a Intensidade luminosa e a concentração de sacarose após 45 dias de cultivo *in vitro*. Campos dos Goytacazes, 2019.

Intensidade luminosa ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Massa da matéria seca da raiz (mg)	
	Sacarose (g L ⁻¹)	
	0	20 g L ⁻¹
65	8,25 aA	11,75 bA
121	6,45 aB	17,49 aA
240	8,91 aB	12,62 aA
C.V. (%)	15,94	

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste F e Tukey ($P \leq 0,05$), respectivamente.

A massa da matéria seca total foi menor em plantas sem sacarose (Figura 22). Resultados semelhantes foram encontrados nos trabalhos de Walter (2015) e Barbosa (2016). O uso de concentrações de sacarose de até 20 g L⁻¹ no meio de cultura proporciona aumento na massa da matéria seca total de pimentas do gênero *Capsicum*. Quando se aumenta as concentrações de sacarose independente do tipo de vedação há maior acúmulo de biomassa vegetal. Porém quando se associa com o uso de membranas permeáveis a gases ocorre um maior incremento na biomassa vegetal de pimentão. Assim verifica-se que o aumento da biomassa vegetal no cultivo *in vitro* está relacionado tanto à incorporação de sacarose no meio de cultura quanto ao aumento das trocas gasosas (Xiao et al., 2011).

O menor crescimento das plantas nos tratamentos sem sacarose foi provavelmente resultante do maior investimento no aparato fotossintético da planta, uma vez que a fotossíntese era a principal fonte para a absorção de carbono e produção de energia.

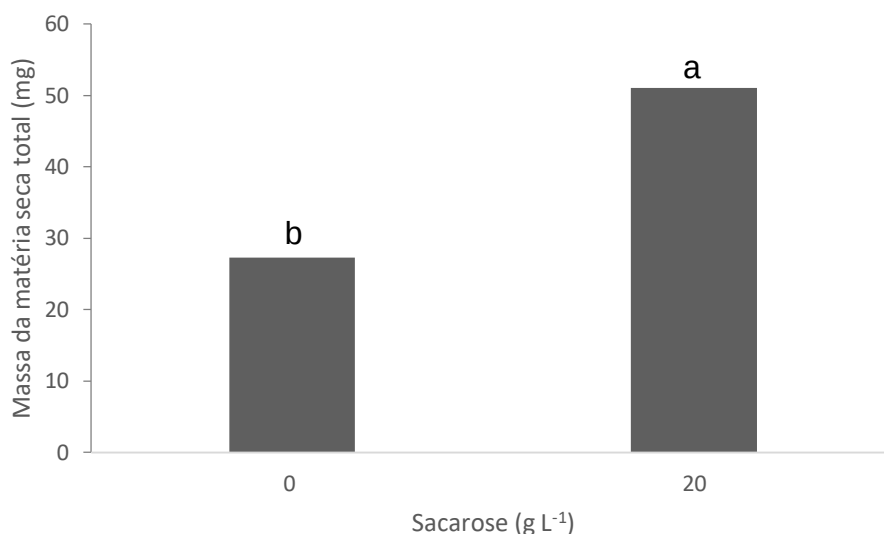


Figura 22. Massa da matéria seca total (MST) de plantas de *Capsicum annuum* germinadas e desenvolvidas *in vitro* em diferentes concentrações de sacarose após 45 dias. Colunas seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste F ($p \leq 0,05$).

De acordo com a análise de variância, as variáveis fisiológicas apresentaram diferenças significativas (Tabela 4). Houve efeito da intensidade luminosa para a relação F_v/F_m e para o índice fotossintético (PI). O tratamento com intensidade luminosa de $65 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ apresentou relação F_v/F_m maior que 0,75, indicando assim um bom funcionamento do PSII (Fotossistema II) (Figura 23A). As intensidades luminosas de 121 e $240 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ocasionaram estresses no PSII das plantas cultivadas nestas condições. Trabalho realizado por Walter (2015) com quatro espécies de *Capsicum* relata um funcionamento adequado dos aparatos fotoquímicos, com uma intensidade luminosa de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de FFF. Assim fica evidente que aumentar apenas a densidade de FFF pode causar estresses no cultivo *in vitro* de *C. annuum*.

O índice fotossintético (PI) avalia não apenas a capacidade do fotossistema II (PSII), mas também do fotossistema I (PSI) (Strasser et al., 2000). O PI apresentou resultado semelhante ao F_v/F_m . O maior PI foi observado na menor intensidade utilizada (Figura 23B).

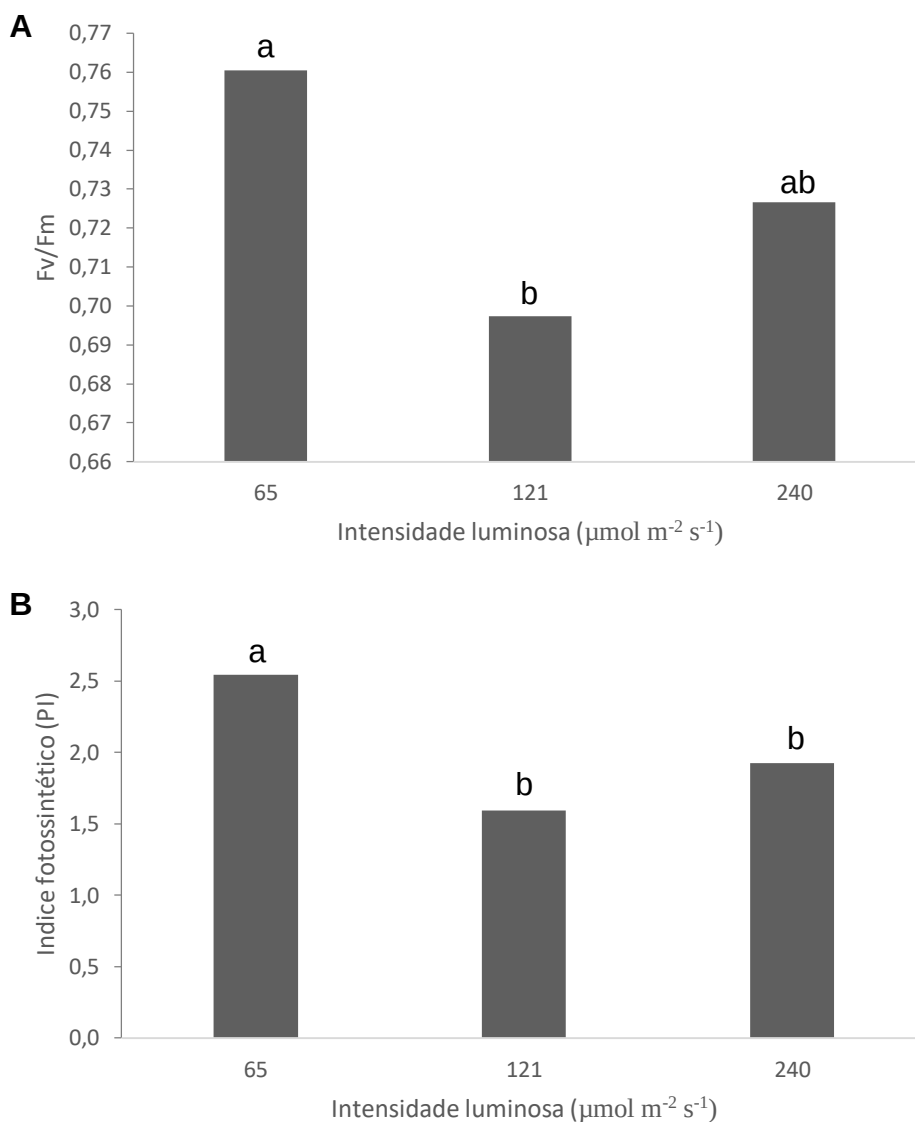


Figura 23. (A) Relação Fv/Fm e (B) Índice fotossintético de *Capsicum annuum* cultivados *in vitro* em diferentes intensidades luminosas após 45 dias. Colunas seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$).

Todos os tratamentos com membranas, independente da ausência ou presença de sacarose, apresentaram valores de F_v/F_m maiores que 0,75, exibindo, portanto, um bom funcionamento do PSII, mostrando a eficiência das membranas na etapa fotoquímica (Tabela 14). Plantas em frascos com vedação de filme PVC ou com tampa rígida, independente da concentração de sacarose, apresentaram um funcionamento irregular do aparato fotossintético. Aspectos semelhantes foram observados para o PI (Tabela 14). No entanto se destaca o tratamento com membrana sem sacarose com maior valor de PI (4,46), diferindo estatisticamente

do tratamento com sacarose (3,02). Ambos diferiram dos demais tipos de vedação (Filme PVC e Tampa rígida).

Vale ressaltar o baixo PI observado no tratamento com filme PVC sem sacarose (0,44). Provavelmente devido, principalmente, a baixa concentração de CO₂ no interior dos frascos, e ausência da fonte de carbono exógeno no meio de cultura. Fica evidente que possivelmente essas plantas em frascos sem as membranas permeáveis mostraram estresses no PSII e PSI. Resultado semelhante foi exposto por Barbosa (2016) com *Capsicum frutescens*.

Tabela 14. Relação F_v/F_m e índice fotossintético (PI) de plantas de *Capsicum annuum* em função da interação entre a concentração de sacarose e o tipo de vedação após 45 dias de cultivo *in vitro*. Campos dos Goytacazes, 2019.

	F _v /F _m	
Vedação	Sacarose (g L ⁻¹)	
	0	20
Filme PVC	0,61 cB	0,72 bA
Tampa Rígida	0,71 bA	0,74 abA
Membrana	0,81 aA	0,78 aA
C.V. (%)	2,56	
Índice fotossintético (PI)		
Vedação	Sacarose (g L ⁻¹)	
	0	20
Filme PVC	0,44 cB	1,38 bA
Tampa Rígida	1,31 bA	1,45 bA
Membrana	4,46 aA	3,02 aB
C.V. (%)	15,43	

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste F e Tukey ($P \leq 0,05$), respectivamente.

A eficiência da ventilação nos frascos de cultivo foi verificada também por Mohamed e Alsadon (2011). Plantas de pimentão cultivadas *in vitro* em frascos com ventilação de CO₂ apresentaram aumento no crescimento, maior acúmulo de matéria seca, maior taxa fotossintética, maiores concentrações de clorofila e carotenoides. Batista (2012), cultivando plantas de pimenta ornamental (*Capsicum annuum* L.) em frascos com membranas ventiladas obteve resultados semelhantes: maior número de folhas e maior acúmulo de biomassa.

O uso de membranas permitiu maior ventilação, provavelmente aumentando as concentrações de CO₂ no interior dos frascos, proporcionando aumento na área foliar e o aumento das taxas fotossintéticas (Kitaya et al., 2005; Iarema et al., 2012).

Os valores SPAD avaliam a intensidade de verde nas folhas, e está relacionado com as concentrações de clorofila, ou seja, quanto maior o valor, maior a concentração de clorofila. Os valores de SPAD podem, também, estar relacionados com a disponibilidade de nitrogênio e com o estresse hídrico nas plantas (Buckland et al., 1991; Torres Neto et al., 2002).

Maiores índices de verde foram obtidos nas plantas em menores intensidades luminosas. Na ausência de sacarose as intensidades de 65 e 121 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de FFF promoveram os maiores valores de SPAD, já com 20 g L⁻¹ de sacarose apenas a menor intensidade apresentou diferenças significativas. Altas intensidades luminosas em interação com a sacarose ocasionaram folhas menos verdes (Tabela 15) (Figura 19). Vale destacar ainda, que na condição de maior intensidade luminosa (240 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) sem sacarose ao meio as plantas apresentaram o menor índice de SPAD. Com relação a interação entre a intensidade luminosa e o tipo de vedação verifica-se que os maiores índices de SPAD são observados quando se utiliza frascos com membranas permeáveis em intensidades luminosas de 121 e 240 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Já com uma intensidade de 65 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ não há diferenças em relação ao tipo de vedação (Tabela 16). Altas intensidades luminosas com vedações que não permitem aumentos nas trocas gasosas resultam em plantas com menor intensidade de verde quando comparadas com plantas cultivadas em sistema que permite trocas gasosas.

Plantas cultivadas na menor intensidade luminosa (65 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) sem sacarose e com membrana permeável apresentaram hiperidricidade (Figura 24). Este problema foi solucionado com o uso de intensidades mais elevadas e adição da sacarose ao meio de cultura. Ivanova e Staden (2010), trabalhando com plantas de *Aloe polyphylla* Schönland ex Pillans conseguiram eliminar completamente a ocorrência de hiperidricidade usando as membranas permeáveis. No entanto, no presente trabalho, verifica-se que plantas de *C. annuum* em baixas densidades de FFF com membranas permeáveis a gases e sem sacarose apresentaram características indesejadas, como crescimento reduzido e folhas cloróticas.

Tabela 15. Análise de desdobramento do índice de SPAD de plantas de *Capsicum annuum* em função da interação entre a Intensidade luminosa e a concentração de sacarose após 45 dias de cultivo *in vitro*. Campos dos Goytacazes, 2019.

Intensidade luminosa ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	SPAD	
	Sacarose (g L^{-1})	
	0	20
65	33,22 aB	38,35 aA
121	31,37 abA	29,97 bA
240	26,22 bB	32,23 bA
C.V. (%)	16,35	

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste F e Tukey ($P \leq 0,05$), respectivamente.

Tabela 16. Índice de SPAD de plantas de *Capsicum annuum* em função da interação entre a Intensidade luminosa e o tipo de vedação após 45 dias de cultivo *in vitro*. Campos dos Goytacazes, 2019.

Vedação	SPAD		
	Intensidade luminosa ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)		
	65	121	240
Filme PVC	35,10 aA	26,12 bB	24,53 bB
Tampa Rígida	35,08 aA	27,66 bB	23,96 bB
Membrana	37,17 aA	38,23 aA	38,90 aA
C.V. (%)	16,35		

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$).

Plantas cultivadas em frascos com vedação de filme PVC e tampa rígida nas maiores intensidades apresentaram clorose nas folhas (Figura 25). As plantas de *C. annuum* colocadas em condições de alta densidade de FFF geralmente estão predispostas a sofrerem com fotoinibição, o que pode levar a morte da planta, e como resultado deste problema, a assimilação de CO_2 pode ser reduzida (Van Huylenbroeck, 1994; Van Huylenbroeck et al., 2000). A baixa intensidade com a tampa rígida e o filme PVC não causaram este estresse nas plantas. Trabalhos com cultivo de plantas *in vitro* em frascos vedados com tampas rígidas e em condições de baixas densidades de FFF (geralmente de 30 a 60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) não apresentam problemas de clorose (Walter et al., 2018, 2019).



Figura 24. Planta com aspecto hiperídrico de *Capsicum annuum* cultivada *in vitro* por 45 dias com densidade de FFF de $65 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, sem sacarose e vedada com membrana permeável a gases. Barra = 1 cm.

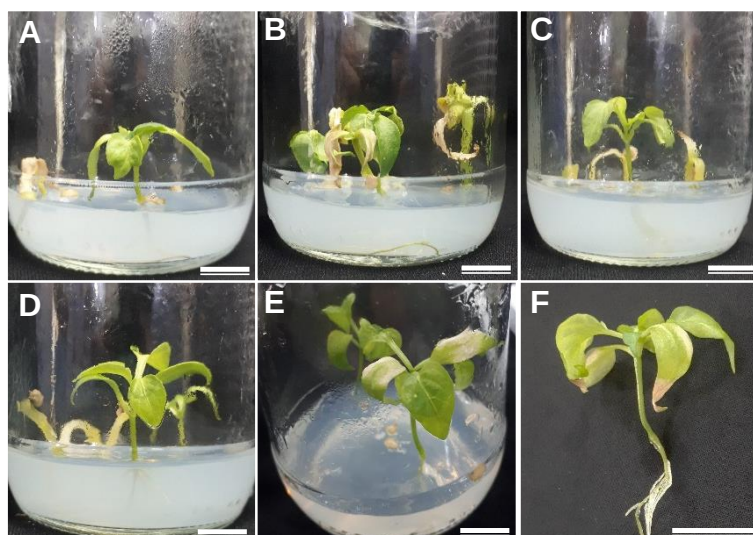


Figura 25. Plantas de *Capsicum annuum*, cultivadas *in vitro* após 45 dias, apresentando clorose nas folhas. A) $240 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, sem sacarose e vedação com filme PVC; B-C) $240 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 20 g L^{-1} de sacarose e vedação com filme PVC; D) $240 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 20 g L^{-1} de sacarose e vedação com tampa rígida; E-F) $121 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 20 g L^{-1} de sacarose e vedação com tampa rígida. Barra = 1 cm.

Plantas em frascos com filme PVC com ou sem sacarose mostraram visualmente pouco crescimento e folhas amareladas e cloróticas (Figura 19A, D, G, J, M, P). Plantas em frascos vedados com tampa rígida também apresentaram crescimento reduzido, principalmente na ausência de sacarose e na intensidade de $240 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 19B, E, H, K, N, Q). O mesmo é observado para as raízes

(Figura 21). Provavelmente estas plantas sofreram de fotoinibição com o aumento da densidade de FFF e a restrição das trocas gasosas e, conseqüentemente, a reduzida entrada de CO₂ atmosférico para o interior do frasco. Para o sucesso do cultivo *in vitro* fotoautotrófico é preciso que haja otimização da entrada de CO₂ e aumento dos FFF, concomitantemente (López et al., 2015). Nas intensidades mais baixas as plantas apresentaram coloração verde mais escura, provavelmente devido ao aumento das concentrações de clorofila *b*. No entanto, quando aumentamos o FFF para 240 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e não promovemos trocas gasosas às plantas sofreram estresse por luz e as moléculas de clorofila foram degradadas (Faisal e Anis, 2009; Barbosa, 2016).

A otimização da entrada de CO₂ no interior dos frascos, estimulam o aumento das taxas fotossintéticas e, conseqüentemente, aumenta a intensidade de verde nas folhas de pimenta que está relacionada com o aumento das concentrações de clorofila. O uso de frascos com membranas porosas diminui a ocorrência de clorose e senescência das folhas (Rodrigues et al., 2012).

As plantas cultivadas nos frascos sem membrana podem ter sofrido também com o acúmulo de etileno. O etileno desempenha importantes funções na ativação de respostas de plantas a estresses diversos. Participa também das redes de sinalização de outros fitormônios como o ácido jasmônico, o ácido salicílico e o ácido abscísico, tendo assim uma influência direta no processo morfogênico (Adie et al., 2007; Kwon et al., 2009). O acúmulo de etileno resulta em efeitos prejudiciais ao crescimento das plantas durante o cultivo *in vitro*. A redução na concentração interna de etileno pode ser resolvida com o uso de tampas que possibilitem as trocas gasosas e a renovação do microambiente dentro do frasco (Torres et al., 1999; Filho et al., 2002). Assim a modificação do microambiente do frasco de cultura promovida pelas trocas gasosas favorece a manutenção da concentração de CO₂ adequada para estimular a fotossíntese e reduz a concentração de etileno e a umidade relativa dentro dos frascos de cultivo (Kozai et al., 1997; Kozai e Kubota, 2001; Ivanova e Van Staden, 2010; Kozai, 2010; Xiao et al., 2011).

O cultivo *in vitro* usando membranas microporosas permeáveis a gases pode melhorar a difusão de ar e a ventilação natural do recipiente de cultura e aumentar as concentrações de CO₂ no interior do recipiente de cultivo, podendo resultar em maior atividade fotossintética, maior taxa de crescimento e maior sobrevivência na etapa de aclimatização (Fujiwara e Kozai, 1995; Xiao et al., 2011; Saldanha et al.,

2012). Essas membranas microporosas são materiais permeáveis a gases que facilitam as trocas gasosas e a difusão do CO₂ para o interior do frasco de cultivo. Além disso, a umidade relativa no interior do recipiente de cultura é reduzida, o que estimula o aumento da transpiração e a absorção de água e nutrientes pelo explante (Kozai e Kubota, 2001).

3.2.5. CONCLUSÕES

Plantas de pimentão (*C. annuum*) cultivadas *in vitro* em altas intensidades de FFF, entre 121 a 240 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, em frascos que permitam aumento das trocas gasosas, como as membranas permeáveis a gases e na ausência de sacarose no meio de cultura aumentam significativamente o potencial fisiológico, o incremento na massa da matéria seca, aumento de área foliar e de volume radicular, maior comprimento de parte aérea e número de folhas sem alterações fisiológicas. Para o cultivo de *C. annuum in vitro* o recomendado é o uso de membranas permeáveis a gases, e nas combinações de densidade de FFF e sacarose de 65 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ com 20 g L⁻¹ de sacarose, 121 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ com 20 e 0 g L⁻¹ de sacarose e 240 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ na ausência de sacarose.

3.3. EXPLORANDO O POTENCIAL ORNAMENTAL DE UMA POPULAÇÃO SEGREGANTE DE *Capsicum*

3.3.1. INTRODUÇÃO

O gênero *Capsicum* (Solanaceae) é amplamente cultivado no Brasil e possui uma grande variabilidade de formatos, tamanhos e colorações de frutos e inclui variedades como pimentões e pimentas doces (Buso et al., 2001). Além disso, este gênero abrange pimenteiras ornamentais.

Esta ampla disponibilidade de variedades é de grande importância para o mercado brasileiro, abrangendo o uso como matéria-prima para as indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética (Rêgo et al., 2009). O mercado ainda abrange a comercialização de frutos para consumo *in natura*, conservas caseiras, exportação de páprica e a produção de plantas floridas para fins ornamentais (Macedo, 2015; Ohara e Pinto, 2012). Ademais, as pimentas apresentam ainda grande importância social, uma vez que o agronegócio requer grande quantidade de mão de obra, em especial, durante a colheita. Concomitantemente, a crescente demanda interna tem impulsionado o aumento de área cultivada e o estabelecimento de agroindústrias, o que torna o agronegócio de *Capsicum* um dos mais importantes do Brasil (Panorama Rural, 2006).

Parte valiosa do patrimônio da biodiversidade, pimentas do gênero *Capsicum* estão intimamente relacionadas com a riqueza cultural brasileira. As cultivares disponíveis apresentam grande variabilidade quanto aos tipos, tamanhos, cores,

sabores e pungência (Neitzke et al., 2008; Nascimento et al., 2012). Essa diversidade pode ser usada como base para programas de melhoramento genético (Rêgo et al., 2003).

As espécies de *Capsicum* possuem excelente potencial para a comercialização como planta ornamental. O cultivo de pimenteiras em vaso tem crescido bastante devido às suas características de baixo porte, diversidade de cor e forma dos frutos, além do tempo relativamente curto de produção, da fácil germinação das sementes, da tolerância ao calor e da harmonia do vaso, que contribuem para a crescente utilização destas plantas como ornamentais (Stommel e Bosland, 2005; Barroso et al., 2012; Nascimento et al., 2013).

A diversidade disponível dentro destas espécies domesticadas tem sido pouco explorada e ainda não foi esgotada. No Brasil ainda são poucas as variedades comerciais destinadas a ornamentação, tornando-se viável o estudo do potencial ornamental dos materiais genéticos mantidos em coleções de germoplasma, os quais devem ser caracterizados e avaliados tendo como objetivo determinar a diversidade genética, permitindo a identificação de acessos úteis em programas de melhoramento de plantas (Sudré et al., 2010; Melo et al., 2014).

Essa divergência genética pode ser analisada por meio de métodos preditivos que levam em consideração caracteres agronômicos, fisiológicos, morfológicos e moleculares (Costa et al., 2009; Rêgo et al., 2011).

Uma técnica que permite a análise simultânea de variáveis quantitativas e qualitativas foi proposta por Gower (1971), por meio de um algoritmo que estima a similaridade entre os indivíduos utilizando variáveis com distribuições contínuas e discretas. Este método é eficiente na discriminação de grupos, demonstrando que a análise simultânea de variáveis qualitativas e quantitativas é viável e pode permitir maior eficiência no conhecimento da divergência entre acessos de bancos de germoplasma. Assim, com o uso de ferramentas estatísticas apropriadas torna-se possível a geração de informações mais seguras sobre a variabilidade e a divergência genética entre os acessos (Moura et al., 2010; Rocha et al., 2010; Nascimento et al., 2011; Rêgo et al., 2011; Rêgo et al., 2013).

Os trabalhos realizados por Silva et al. (2015; 2017) destacam o potencial de genótipos de *Capsicum* para o crescente mercado de pimenteiras ornamentais baseados no porte pequeno das plantas (até 30 cm), na precocidade para o florescimento e frutificação e no alto número de frutos por planta. Outros trabalhos

também evidenciam o potencial de genótipos de *Capsicum* para a mesma finalidade (Melo et al., 2014; Pessoa et al., 2015; Rêgo et al., 2015; Nascimento et al., 2015; Batista et al., 2017).

Este trabalho objetivou estimar a divergência genética em uma população segregante entre *Capsicum annuum* var. *glabriusculum* X *C. annuum* var. *annuum*, com base na análise conjunta das variáveis qualitativas e quantitativas, utilizando o algoritmo de Gower. Visou ainda identificar possíveis marcadores morfológicos relacionando o tamanho do botão floral com o estágio de desenvolvimento do micrósporo e testar protocolos para a indução de plantas duplo-haploides a partir da cultura de anteras.

3.3.2. REVISÃO

3.3.2.1. Importância cultural e econômica

A pimenta desde os primórdios da civilização tem sido utilizada para tempero, conservante de alimentos, planta ornamental e fins medicinais (Rufino e Penteado, 2006). Segundo Ishikawa et al. (1998), a presença de alcaloides denominados capsaicinoides, especialmente a capsaicina e a diidrocapsaicina, são exclusivos do gênero *Capsicum*. Tais alcaloides são produzidos na placenta sendo responsáveis pela pungência do fruto (sabor ardido ou efeito picante). A maioria das variedades de pimenta produz frutos pungentes, enquanto que os sem pungência são classificados como doces.

Cerca de um quarto da população mundial consome pimentas nas formas fresca ou processada (Carvalho et al., 2006). No ano de 2013, a maior concentração de área colhida de pimentas foi no Continente Asiático (64%), seguido do Continente Africano 18%, Americano 11% e Europa e Oceania, juntos somando 7% (FAOSTAT, 2015). Já no Brasil, a produção de pimentas vem crescendo muito, com mercado estimado em mais de R\$100 milhões ao ano (Reifschneider e Ribeiro, 2008). O cultivo é realizado praticamente em todas as regiões e vem se destacando como um importante nicho de mercado no agronegócio brasileiro (Rufino e Penteado, 2006).

Devido à sua versatilidade e ocorrendo em quase todas as regiões brasileiras, o cultivo da pimenta é um dos melhores exemplos de agricultura familiar e da integração de pequenos produtores e da indústria (Leite et al., 2008).

As pimentas podem ser usadas como condimentos, na forma de conservas, extratos concentrados denominados óleo resina, em pó, corantes, como flavorizante, substâncias utilizadas em produtos alimentícios, dentre outros. Além da importância culinária, também são empregadas como produto da indústria bélica, na confecção de *spray* de pimenta fabricado a partir do óleo resina. São usadas, ainda, na forma de pó, adicionadas a sementes destinadas à alimentação de aves, para fins de prevenção do ataque de esquilos. Na forma de gel, em fios de sutura veterinária, para prevenir a remoção dos pontos cirúrgicos pelos animais e em fios de telefone, para prevenção do ataque de cães e gatos (Pinto et al., 2013).

As pimentas produzem frutos com altos valores vitamínicos, além de ser fonte de antioxidantes naturais como a vitamina C, cujos teores superam os dos cítricos. Ainda destaca-se neste gênero os carotenoides por serem importantes fontes de vitaminas A, vitamina E e vitaminas do complexo B1 e B2 e de minerais como Ca, P e Fe, cujas concentrações podem variar com o genótipo e grau de maturação, além de compostos fenólicos, e os capsaicinoides que conferem a pungência ou ardume, o principal atributo das pimentas (Nuez et al., 1996; Pinto et al., 2013).

3.3.2.2. Pesquisa no Brasil em *Capsicum* com finalidade ornamental

No Brasil pelo menos 17 universidades realizam pesquisas com *Capsicum* spp. (Silva, 2004). Dentre elas, algumas pesquisam espécies de *Capsicum* com finalidade ornamental, como a Universidade Federal de Pelotas - UFPel; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF, Universidade Federal de Viçosa - UFV; Universidade Federal da Paraíba - UFPB; Universidade Federal de Lavras - UFLA e Universidade Federal do Piauí - UFPI. Na UFPel, Neitzke et al. (2016) avaliaram a aceitação e as preferências do consumidor em relação a pimentas ornamentais do Banco de Germoplasma de *Capsicum* da Embrapa Clima Temperado, e os acessos preferidos foram os com coloração final vermelha. Na UENF, trabalhos foram realizados com objetivo de identificar e disponibilizar ao mercado, novas cultivares de pimenta ornamental (Silva et al., 2015).

Na UFV, Nascimento et al. (2015), avaliando a qualidade pós-produção das pimentas ornamentais conseguiram selecionar plantas de *Capsicum* resistentes à abscisão de folhas induzida pelo etileno. No mesmo sentido, na UFPB, Rêgo et al. (2015), avaliando e selecionando linhagens para promover a hibridação entre as linhas selecionadas, obtiveram plantas com flores maiores e linhagens selecionadas para o aumento da vida de prateleira.

Na UFPI, Melo et al. (2014), selecionando acessos com potencial ornamental, concluíram que plantas de pimenta que tiveram estética mais harmoniosa foram as de flores eretas, as quais são de fácil percepção; frutos eretos e vistosos e folhas de formato lanceolado. Estes e outros trabalhos destas instituições confirmam a importância da cultura e do seu uso como ornamental.

No mercado brasileiro, algumas das pimentas registradas para fins ornamentais são: 'Pirâmide Ornamental'; 'Espaguete Ornamental'; 'Calypso'; 'Sangria'; 'Purple Flash'; 'Gardatricolore' (que foi considerada a primeira pimenta ornamental de jardim); 'Numex Centennial' (desenvolvida pela NMSU - New Mexico State University). Todas essas são da espécie *C. annuum*, e são resultados de programas de melhoramento conduzidos fora do país. Segundo Neitzke et al. (2016), as novas cultivares de pimentas ornamentais só são justificadas se estas constituírem novidades para o mercado da floricultura, ou se tiverem alguma característica que diferencie das demais já disponíveis no mercado.

Deve-se considerar para o desenvolvimento dessas novas cultivares os genótipos já disponíveis e as exigências e preferências do mercado consumidor (Ribeiro e Reifschneider, 2008). O conhecimento das necessidades e preferências dos consumidores aumenta as chances de bons resultados no lançamento de uma cultivar.

No Brasil, são poucos os trabalhos realizados a fim de caracterizar o ideótipo de plantas ornamentais desejadas pelo consumidor. Neitzke et al. (2016) avaliaram a aceitação e preferências do público consumidor de pimentas ornamentais, sendo necessárias outras avaliações para a correta caracterização do potencial lançamento de novas cultivares.

Entre os programas de melhoramento, objetivando o melhoramento de *Capsicum*, a UENF vem trabalhando para o desenvolvimento de cultivares de pimentas com características agrônômicas desejáveis, como resistência a determinadas doenças, produtividade, e recentemente, visando desenvolver

cultivares adaptadas para atender ao mercado de pimentas ornamentais (Rodrigues et al., 2014).

Como o mercado de pimentas ornamentais está em crescente expansão, há a necessidade de novas cultivares que atendam esse mercado tão exigente, pois o apelo ao consumidor é em função da beleza conferida pela qualidade, vigor, cor, forma e tamanho das folhas e dos frutos e, sobretudo, pelo porte harmonioso da planta com o recipiente utilizado, sendo tudo conferido pela maior padronização da planta (Pinto et al., 2010). Essa maior qualidade está associada à utilização de híbridos, e o sucesso do seu desempenho está na heterose, que é a manifestação do vigor para caracteres de interesse na geração F_1 , em comparação com os genitores. Dentre as vantagens, os híbridos expressam maior uniformidade, precocidade, produtividade e resistência a doenças e pragas (Charlo et al., 2011).

3.3.2.3. Melhoramento de pimentas do gênero *Capsicum*

Muitos métodos são utilizados nos programas de melhoramento visando desenvolver cultivares, sendo a escolha de cada um deles baseada em uma série de fatores: objetivos do programa, sistemas reprodutivos da cultura a ser melhorada, herança genética da característica desejada e variabilidade da população base (Allard, 1971; Rêgo, 2011). Os métodos de melhoramento massal e *pedigree* são os mais usados para obtenção de cultivares de pimentas ornamentais, de acordo com Bosland (1996) e Stommel e Bosland (2005). Bosland e Gonzalez (1994), por exemplo, relatam o desenvolvimento da cultivar de pimenta ornamental 'NuMex Mirasol' utilizando o método *pedigree*.

Com a crescente demanda das pimentas para fins ornamentais, há necessidade de novos produtos adaptados às condições locais e com poucos programas de melhoramento atuando neste segmento de mercado há um estímulo para que haja a participação de melhoristas para atuarem no desenvolvimento de novas cultivares que atendam a demanda no mercado brasileiro de plantas ornamentais (Rêgo et al., 2012a).

Os programas de melhoramentos são cada vez mais responsáveis por suprir a necessidade de cultivares mais adaptadas e responsivas às condições climáticas a fim de atender as necessidades da população. Deste modo, o uso de estratégias como a hibridação, que promovam o desenvolvimento de novos produtos e seja

utilizado de forma mais rápida. A utilização de genitores superiores para serem empregados no processo de hibridação tem sido uma estratégia realizada em diversas culturas hortícolas, destacando as solanáceas como berinjela, tomate, pimenta e pimentão (Maluf, 2001). Apesar de ser um processo mais trabalhoso visto que há a necessidade de realizar cruzamentos manuais, em relação às cultivares de polinização aberta, implica em sementes de maior valor unitário e na obtenção de plantas com características desejáveis (Maluf, 2001).

O uso de híbridos possui vantagens como a possibilidade de combinar diferentes e interessantes características qualitativas e quantitativas. O aumento de qualidade e produtividade, uniformidade e resistência a patógenos estão entre os principais caracteres de interesse nos programas de melhoramento. Já as dificuldades apresentadas pela hibridação estão atreladas a produção da semente híbrida, em que há a necessidade de treinamento para a execução da emasculação e polinização, além de sofrer influência da temperatura, e também pelo fato da produção das sementes híbridas serem, em sua maioria, de posse das empresas privadas, o que torna o pequeno produtor a mercê de seu constante consumo (Miranda e Casali, 1988; Maluf, 2001).

Para *Capsicum* ornamental, trabalhos como o de Nascimento et al. (2012) e Nascimento et al. (2013) discutem a importância da hibridação como uma fonte de novas combinações genéticas a fim de obter características interessantes que podem ser exploradas nos programas de melhoramento para esta finalidade.

3.3.2.4. Produção de duplo-haploides

Em função da demora e do custo para obtenção das linhagens, os melhoristas, há muito tempo, têm procurado alternativas que agilizem e reduzam os gastos desse processo. Reduzir o tempo necessário para produção de uma nova variedade significa diminuição nos custos e antecipação dos lucros (Kim et al., 2013).

Uma alternativa é o emprego da tecnologia de duplo-haploides (DH). Isto é, a geração de plântulas a partir de células haploides e posterior duplicação do material genético. Plantas haploides podem ocorrer espontaneamente na natureza ou elas podem ser induzidas experimentalmente. No entanto, a ocorrência natural da haploidia é considerada rara (Ahmed et al., 2001).

A principal vantagem é que, com os DH, obtêm-se linhagens com todos os locus em homozigose. Quando se utiliza o processo tradicional, mesmo após seis a oito gerações de autofecundação, ainda ocorrem locus em heterozigose (Irikova et al., 2011).

No processo de obtenção de linhagens DH, assim como no sistema de autofecundações tradicionais, é feita a seleção *per se* dos melhores genótipos. No entanto, essa seleção é realizada em uma etapa posterior, após a obtenção e duplicação do indivíduo haploide. E, por não haver a necessidade de autofecundações sucessivas, no sistema DH, é possível avaliar um número bem maior de plantas (Pierre et al., 2011).

Outra vantagem dos DH é a possibilidade de obter milhares de linhagens de cada população. No momento, essa vantagem é ainda potencial, porque o percentual de indução de haploides tem sido baixo e, mais ainda, a taxa de duplicação dos haploides é muito pequena (Pierre et al., 2011). Também tem sido colocada como vantagem desta tecnologia a melhor qualidade nos experimentos de avaliações dos híbridos, uma vez que todas as plantas geradas de uma semente haploide serão idênticas (Milach, 2007).

Três métodos para a obtenção de DH *in vitro* têm sido utilizados: cultura de anteras/pólen; cultura de ovários/oosferas; eliminação de cromossomos (Irikova et al., 2011; Pierre et al., 2011).

A maneira mais utilizada para produção de haploides é por meio da cultura de anteras, também chamada de androgênese. Apesar de existirem relatos de formação de haploides a partir de anteras em mais de 250 espécies, o uso dessa técnica no melhoramento tem sido limitado a poucas espécies como fumo, trigo, tritcale, arroz, milho, colza e couve (Peters et al., 1999).

3.3.3. MATERIAL E MÉTODOS

3.3.3.1. Germoplasma

Foram estudados 161 genótipos de uma população segregante F₂ provenientes do cruzamento entre *Capsicum annuum* var. *glabriusculum* (UENF 1750) x *C. annuum* var. *annuum* (UENF 2030) do programa de melhoramento

genético de *Capsicum* da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) selecionados em estudos preliminares de indicação de genitores e híbridos com potencial para ornamentação (Silva et al., 2015, 2017) (Tabela 17, Figura 26).

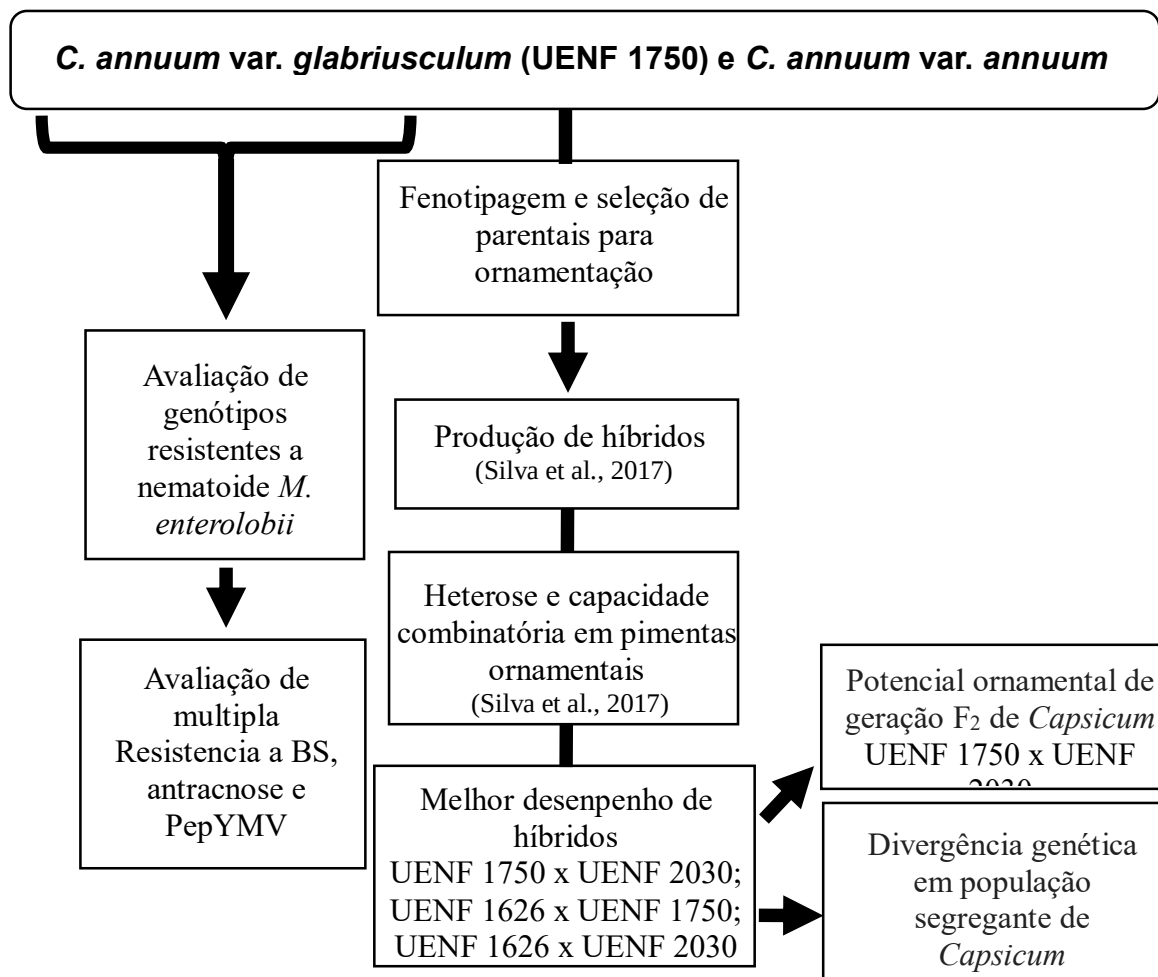


Figura 26. Fluxograma do programa de melhoramento genético de *Capsicum* para ornamentação.

Tabela 17. Acessos de *Capsicum*, utilizados para obtenção dos híbridos, com suas respectivas características ornamentais. Fonte: Silva et al. (2017)

Acessos	Altura (cm)	NEM	FF (mm)	HAB	CCO	CAN
<i>C. annuum</i> var. <i>glabriusculum</i> (UENF 1750)	37,9	5	arredondado	intermediário	roxa	roxa
<i>C. annuum</i> var. <i>annuum</i> (UENF 2030)	35,0	3	triangular	ereto	branca	azul claro

*NEM = número de estádios de maturação do fruto; FF = forma do fruto; HAB = hábito de crescimento; CCO= coloração da corola; CAN= coloração da antera.

3.3.3.2. Caracterização da população segregante

3.3.3.2.1. Condução do experimento

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, no município de Campos dos Goytacazes, RJ, no período de julho de 2016 a maio de 2017, com temperatura de máxima, média e mínima de 40,75°C, 27,64°C e 20,74°C, respectivamente. Assim como umidade relativa de 86,64%, 69,01% e 41,46%, de máxima, média e mínima, respectivamente (Figura 27). A semeadura foi realizada em bandejas de poliestireno expandido de 128 células preenchidas com substrato comercial Basaplant®. As mudas foram transplantadas 45 dias após a semeadura para vasos plásticos de 5 L, contendo uma mistura de solo e areia na proporção de 1:1,5. Utilizou-se o delineamento inteiramente ao acaso.

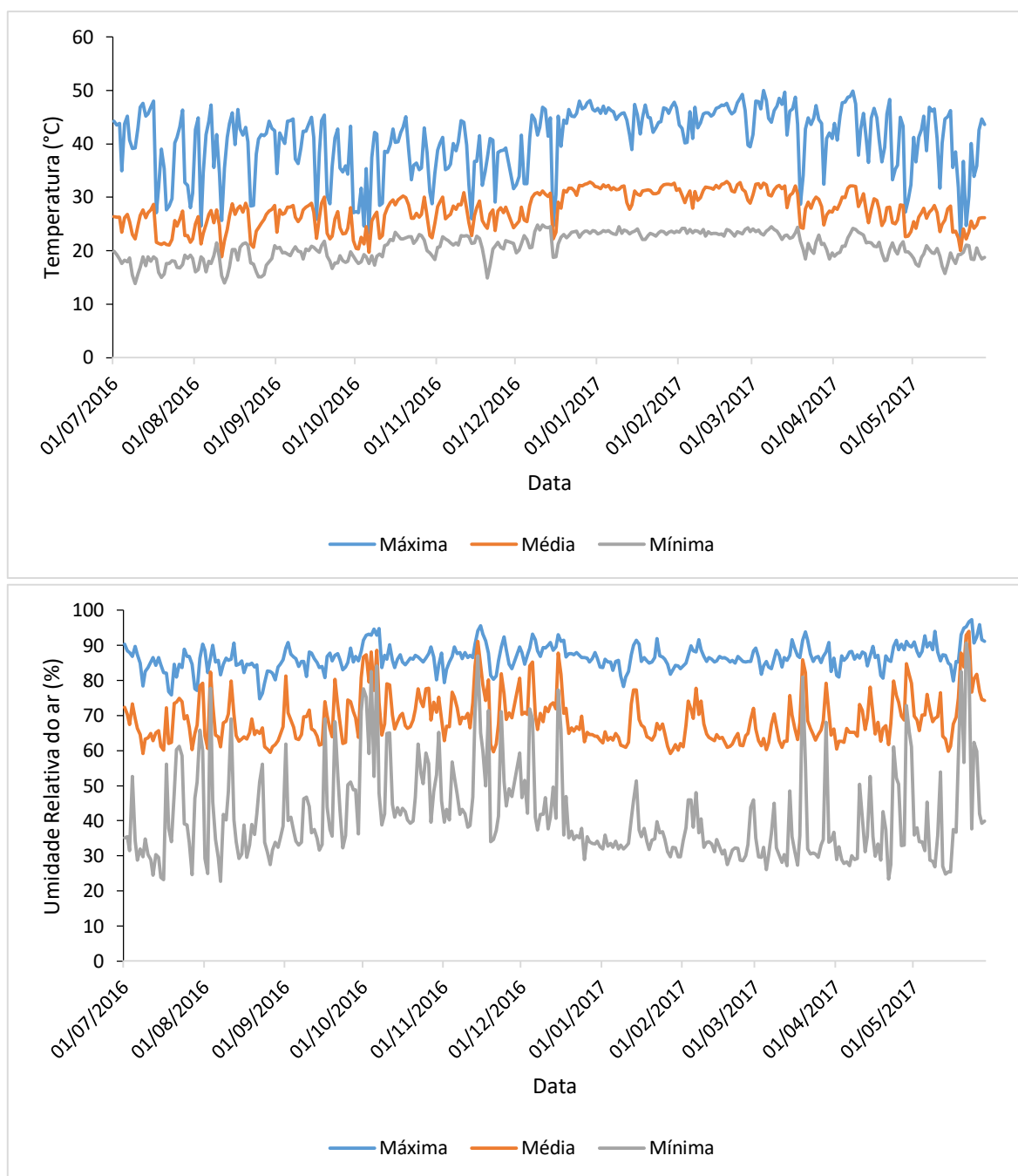


Figura 27. Máxima, média e mínima da temperatura e umidade relativa do ar, entre julho de 2016 a maio de 2017, da casa de vegetação onde foi conduzido o experimento de caracterização da população segregante entre *Capsicum annuum* var. *glabriusculum* (UENF 1750) x *C. annuum* var. *annuum* (UENF 2030) no município de Campos dos Goytacazes- RJ.

3.3.3.2.2. Caracterização morfoagronômica

Para a caracterização morfoagronômica dos genótipos foram utilizados 16 descritores, estabelecidos pelo IPGRI (1995), com algumas alterações sugeridas por Carvalho et al. (2003), dez qualitativos e seis quantitativos. Os descritores qualitativos foram: hábito de crescimento; cor da folha; posição da flor; cor da corola; cor da antera; posição e formato do fruto; número de estágio de maturação do fruto; persistência do fruto; e cor da semente. Em relação aos descritores quantitativos, foram utilizados: comprimento (mm), diâmetro (mm) e massa do fruto (g); comprimento do pedúnculo (mm); e número de pétalas e anteras. Para os descritores quantitativos foram analisados cinco frutos de cada genótipo.

A estimativa da matriz de distância genética foi realizada por meio da análise conjunta das variáveis quantitativas e qualitativas obtidas com base no algoritmo de Gower (1971), expresso por:

$$S_{ijk} = \frac{\sum_{k=1}^p W_{ijk} \cdot S_{ijk}}{\sum_{k=1}^p W_{ijk}}, \text{ onde:}$$

K = o número de variáveis ($k = 1, 2, \dots, p$); **i** e **j** = dois indivíduos que representem o acesso; **W_{ijk}** = peso dado à comparação **ijk**, atribuindo valor **1** para comparações válidas e valor **0** para comparações inválidas (quando o valor da variável está ausente em um ou ambos indivíduos); **S_{ijk}** = contribuição da variável **k** na similaridade entre os indivíduos **i** e **j**, com valores entre **0** e **1**. Para uma variável qualitativa (nominal), se o valor da variável **k** é o mesmo para ambos os indivíduos, **i** e **j**, então **S_{ijk}** = **1**, caso contrário, é igual a **0**; para uma variável quantitativa (contínua) **S_{ijk}** = $1 - |x_{ik} - x_{jk}| / R_k$ onde **x_{ik}** e **x_{jk}** são os valores da variável **k** para os indivíduos **i** e **j**, respectivamente, e **R_k** é o intervalo (valor máximo menos valor mínimo), da variável **k** na amostra. A divisão por **R_k** elimina as diferenças entre escalas das variáveis, produzindo um valor dentro do intervalo **[0, 1]** e pesos iguais.

Para a estimativa das matrizes de distância genética, a distância generalizada de Mahalanobis segundo Cruz e Regazzi (2001) foi usada para as variáveis quantitativas, e para as variáveis qualitativas multicategóricas foi usada a distância de Cole-Rodgers (Cole-Rodgers et al., 1997). A comparação entre as três matrizes de distância foi realizada mediante a correlação entre matrizes (Mantel, 1967).

Os agrupamentos dos genótipos foram obtidos pelos métodos de UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method Using an Arithmetic Average*), Ward e Vizinho Mais Próximo (VMP). A validação dos agrupamentos foi determinada pelo coeficiente de correlação cofenético (CCC) (Sokal e Rolf, 1962). A significância dos coeficientes de correlação cofenético foi calculada pelo teste de Mantel (1967) com 10.000 permutações, utilizando o programa Genes como sugerido por Cruz (2013) bem como, a obtenção das matrizes de distância genética e o cálculo dos coeficientes de correlação cofenético.

3.3.3.3. Cultura de anteras

3.3.3.3.1. Correlação entre o tamanho do botão floral e o estágio de desenvolvimento do micrósporo

Para determinar a correlação entre o tamanho do botão floral e o estágio de desenvolvimento do micrósporo, botões florais dos dois parentais (UENF 1750 e UENF 2030) e oito plantas da geração F_2 foram coletados aleatoriamente e visualmente divididos em três classes com base no tamanho da pétala e da sépala (Tabela 18, Figura 28). Os botões foram avaliados em laboratório e aferidos o diâmetro do botão e antera, bem como o comprimento das pétalas, sépalas e anteras.

Tabela 18. Descrição das classes dos botões florais de *Capsicum* estabelecidos para determinar o estágio de desenvolvimento do micrósporo.

Classes	Descrição das classes
Classe 1	Botões florais com pétalas menores que sépalas
Classe 2	Botões florais com pétalas e sépalas com aproximadamente o mesmo tamanho
Classe 3	Botões florais com pétalas maiores que sépalas

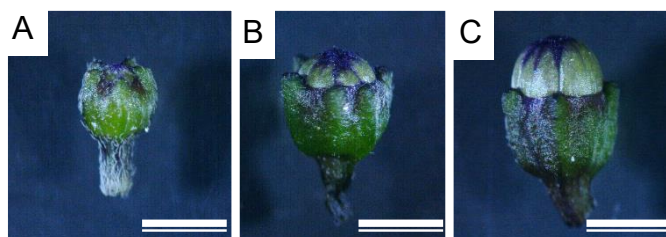


Figura 28. Aspectos morfológicos das classes dos botões florais de *Capsicum* estabelecidos para determinar o estágio de desenvolvimento do micrósporo em híbridos de pimenta ornamental (UENF 1750 x UENF 2030); A) Classe 1; B) Classe 2; C) Classe 3. (bar= 2mm).

Para a determinação do estágio de desenvolvimento do micrósporo, todas as anteras de cada botão floral de cada classe foram analisadas. Cinco anteras por botão foram colocadas em lâminas com uma gota de corante Carmim Acético 2% e maceradas. Estas foram cobertas com lamínula e observadas em microscopia de campo claro e; fotografadas em microscópio óptico (Bioval®). Em cada lâmina foram contabilizados 200 micrósporos totalizando 1200 micrósporos por classe de botão de cada genótipo. Na análise foi contabilizado o número de: células mães do grão de pólen (MP), micrósporos em díades (DI), micrósporos em tétrades (TE), micrósporos uninucleados (UN) e grãos de pólen (GP).

As estimativas de herdabilidade no sentido amplo (h^2) foram calculadas utilizando o seguinte estimador:

$$h^2 = \frac{\hat{\sigma}_g^2}{\hat{\sigma}_p^2} \times 100$$

em que: $\hat{\sigma}_g^2$ = variância genética; $\hat{\sigma}_p^2$ = variância fenotípica. A variância genética foi calculada usando o seguinte estimador:

$$\hat{\sigma}_g^2 = \frac{QM_{TRAT} - QM_{RES}}{r}$$

em que: QM_{TRAT} = quadrado médio do tratamento; QM_{RES} = quadrado médio do resíduo; r = número de repetições.

A razão entre o coeficiente de variação genética e o coeficiente de variação ambiental (CV_g/CV_e) foi calculada e o coeficiente de variância genética (CV_g) foi obtido pela seguinte forma:

$$CV_g (\%) = \left(\frac{\sqrt{\sigma^2 g}}{M} \right) \times 100$$

em que: σ^2 = variância genética; M = média experimental.

O coeficiente de variância ambiental (CV_e) foi obtido da seguinte forma:

$$CV_e (\%) = \left(\frac{\sqrt{QM_{RES}}}{M} \right) \times 100$$

em que : QM_{RES} = quadrado médio do resíduo; M = média experimental.

A análise de correlação de Pearson foi realizada com as médias obtidas das cinco anteras analisadas de cada botão, com três botões por classe, totalizando 15 anteras por classe. As análises foram realizadas com o auxílio do programa Genes[®] (Cruz, 2013).

3.3.3.3.2. Indução de embriogênese via cultura de anteras

Para a indução de embriões haploides, foram usadas anteras de 10 genótipos: dois parentais (G1 = UENF 1750 e G2 = UENF 2030) e oito genótipos da geração F_2 contendo a maior concentração de micrósporos no estágio uninucleado, botões da classe 2 (Tabela 2) determinado pelo experimento anterior.

No laboratório, em câmara de fluxo laminar, os botões florais da classe 2 foram desinfestados por imersão em 100 mL de hipoclorito de sódio (NaClO) a 2%, com três gotas de Tween 20 por 10 minutos. Posteriormente, foram enxaguados durante 5, 10 e 10 minutos em água desionizada e autoclavada.

Após a desinfestação, as anteras foram removidas dos botões florais com pinças e bisturi em microscópio estereoscópico (Tecnival[®]) dentro da câmara de fluxo laminar. As anteras foram inoculadas em placas de Petri (60 mm x 15 mm) com 10 mL de meio de cultura.

3.3.3.3.2.1. Protocolos dos meios para cultura de anteras

Foram testados quatro diferentes protocolos para a cultura de anteras (Tabela 19 e 20). O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 10 x 4 (genótipos x meio), oito genótipos da geração segregante F₂ e os dois parentais e quatro meios de cultura, com quatro repetições. Cada repetição foi constituída por uma placa de Petri com 10 anteras.

Ao final de 60 dias de cultivo *in vitro* foi avaliada a porcentagem de anteras responsivas por genótipo.

Tabela 19. Protocolos de cultura de anteras testados nos dois parentais (UENF 1750 e UENF 2030) e oito plantas da geração F₂ do cruzamento entre *Capsicum glabriusculum* x *Capsicum annuum*.

Meio	Meio básico	Adicionais	Fitorregulador	Temperatura	Baseado em:
M1	C sólido - indução	3% de sacarose	0,01 mg L ⁻¹ de CIN + 0,1 mg L ⁻¹ de 2,4-D (12 dias)	35°C – 8 dias - Escuro	Dumas de Vaulx et al. (1981)
	R sólido - regeneração		0,1 mg L ⁻¹ de CIN (48 dias)	25°C – 52 dias – foto de 12 h	
M2	NN dupla camadas	2% de maltose 0,5% de CA	–	9°C – 7 dias - Escuro	Dolcet-Sanjuan et al. (1997)
		2% de maltose		28°C – 53 dias - Escuro	
M3	½MS dupla camadas	2% de sacarose 0,5% de CA	–	25°C – 60 dias - Escuro	Johansson et al. (1982) e Custers et al. (1999)
		2% de sacarose			
M4	MS sólido	3% de sacarose	1 mg L ⁻¹ de ZEA 1 mg L ⁻¹ de ANA	26°C – 60 dias - 16:8 horas	Wang et al. (1973) Barroso et al., 2015

*Abriviações: CIN= cinetina; 2,4-D= ácido 2,4-diclorofenóxi-acético; ZEA= zeatina; ANA= ácido naftalenoacético; CA= carvão ativado.

Tabela 20. Composição dos meios de cultura utilizados para indução de plantas haploides a partir da cultura de anteras testados nos dois parentais (UENF 1750 e UENF 2030) e em oito plantas da geração F₂ do cruzamento entre *Capsicum glabriusculum* x *Capsicum annuum*.

Constituintes	Concentração no meio de cultura (mg L ⁻¹)				
	MS ^{*1}	NN ^{*2}	NLNS ^{*3}	C ^{*4}	R ^{*4}
KNO ₃	1900	950	125	2150	2150
NH ₄ NO ₃	1650	720	-	1238	1238
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	185	125	412	412
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	220	-	313	313
KH ₂ PO ₄	170	68	125	142	142
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	-	-	500	50	50
PO ₄ NaH ₂ .H ₂ O	-	-	-	38	38
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	-	-	34	34
KCl	-	-	-	7	7
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,300	25,000	22,300	-	-
MnSO ₄ .H ₂ O	-	-	-	22,130	20,130
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,600	10,000	8,600	3,625	3,225
H ₃ BO ₃	6,200	10,000	6,200	3,150	1,550
KI	0,830	-	0,830	0,695	0,330
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,250	0,250	0,250	0,188	0,138
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	-	0,025	0,016	0,011
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	0,025	0,025	0,016	0,011
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,800	27,800	27,800	13,900	13,900
Na ₂ .EDTA.2H ₂ O	37,300	37,300	37,200	18,650	18,650
Mio-inositol	100,000	100,000	100,000	50,300	50,300
Ácido nicotínico	0,500	5,000	5,000	0,700	0,700
Piridoxina	0,500	0,500	0,500	5,500	5,500
Tiamina	0,100	0,500	0,500	0,600	0,600
Glicina	2,000	2,000	2,000	0,100	0,100
Biotina	-	0,500	0,050	0,005	0,005
Ácido fólico	-	0,500	0,500	-	-
Vitaminas B ₁₂	-	-	-	0,030	-
Ca-pantotenato	-	-	-	0,500	0,500
Glutamina	-	-	800,000	-	-
Serina	-	-	100,000	-	-
Glutaciona	-	-	30,000	-	-

*¹ - Murashige e Skoog, 1962; *² - Nitsch e Nitsch, 1969; *³ - Lichter, 1981; *⁴ - Dumas de Vaulx et al., 1981.

3.3.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.4.1. Caracterização da população segregante

Detectou-se variabilidade fenotípica entre os genótipos de pimenta estudados com base nos descritores morfoagronômicos, principalmente nos frutos para os quais foram registradas diferenças visuais acentuadas em termos de tamanho, formato e coloração.

O tamanho dos frutos variou de 9,56 a 38,95 mm, tendo sido o formato alongado predominante em 59,51% dos genótipos, seguido pelos formatos triangular e arredondado em 37,42 e 3,07%, nessa ordem (Figura 29). O tamanho do fruto influencia diretamente na produtividade, de tal forma que, quanto menor o tamanho do fruto, maior será a quantidade de frutos produzidos (Buttow et al., 2010).



Figura 29. Formato dos frutos da população segregante de entre UENF 1750 e UENF 2030. A) alongado; B) triangular; C) arredondado.

Em relação aos estádios de maturação dos frutos, 19,63% dos genótipos apresentaram três estádios de maturação, assim como o parental UENF 2030, as demais progênies e o parental UENF 1750 apresentaram cinco estádios de maturação (Figura 30). Esta característica é bastante importante como característica para ornamentação, uma vez que confere mais cores e atração visual das plantas. Os genótipos apresentaram frutos eretos e de coloração variando entre roxo escuro, roxo claro, laranja e marrom. Porém, no final da maturação, todos apresentaram frutos de cor vermelha. Essas duas características, frutos eretos e

de coloração vermelha quando maduros, são típicas das plantas *C. annuum*, sendo consideradas essenciais para se obter genótipos promissores para o uso ornamental em vasos porque permite o contraste com a folhagem (Sudré et al., 2006).

Para as características relacionadas à flor, 53,99% dos genótipos apresentaram a coloração da corola branca com a borda roxa (Figura 30). Todos os genótipos apresentaram flores eretas. Segundo Ribeiro (2012), a posição ereta da flor é uma característica importante para o potencial ornamental porque deixa as flores em destaque no arranjo floral.

As plantas F_2 que apresentaram corola branca, como o parental UENF 2030, representaram um total de 18,40%. Os demais genótipos apresentaram coloração roxa e roxa com base branca, representando 11,04% e 16,56%, respectivamente.

No mercado de pimentas ornamentais, os descritores cor da corola e cor e formato dos frutos são importantes, pois promovem o contraste com as folhas, expressando suavidade ao arranjo ornamental (Carvalho et al., 2006).

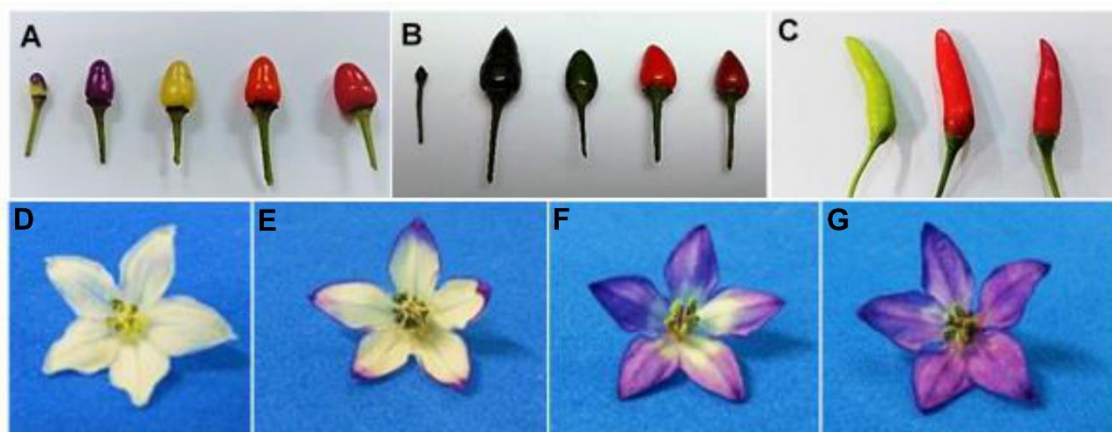


Figura 30. Estádios de maturação dos frutos da população segregante de *Capsicum*: A e B) cinco estádios de maturação; C) três estádios de maturação. D-G) Coloração da corola da população segregante de *Capsicum*; D) Branca; E) branca com borda roxa; F) roxa com base branca; G) roxa.

Uma análise conjunta dos descritores formato e peso do fruto, neste trabalho, permitiu observar uma amplitude de variação de 0,2164 a 1,3659 g no peso dos frutos alongados, que foram os predominantes entre os genótipos e de

0,2665 a 1,2547 g no peso dos frutos triangulares (Figura 31A). Os frutos arredondados obtiveram os menores pesos. Por sua vez, a análise conjunta do formato e comprimento do fruto também evidenciou alta variabilidade para comprimento dos frutos (Figura 31B). Neste caso, os comprimentos dos frutos alongados e triangulares variaram entre 15,63 a 38,95 mm e 11,67 a 33,14 mm, respectivamente. A variância dos frutos arredondados foi de baixa magnitude.

No que diz respeito à análise conjunta dos descritores diâmetro do fruto e formato do fruto, foi possível observar uma maior amplitude para os frutos triangulares, variando de 5,1 mm a 10,1 mm do diâmetro do fruto (Figura 31C). Com relação ao comprimento do pedúnculo, este não apresentou grande diferença em relação aos diferentes formatos de fruto (Figura 31D).

As plantas F_2 não diferiram para os descritores número de anteras e pétalas, cor da semente, posição e persistência do fruto. Este resultado é satisfatório, pois todos foram eretos e persistentes, características ideais para o mercado ornamental.

Todas as correlações entre a matriz de distância conjunta foram significativas pelo teste de Mantel (1967) (Tabela 21). No entanto, observa-se maior correlação das matrizes de Mahalanobis e Cole-Rodgers com a matriz de dissimilaridade da análise conjunta do algoritmo de Gower do que entre elas. Uma vez que o algoritmo de Gower utiliza as variáveis qualitativa e quantitativa ela então torna-se mais precisa pois explora uma diversidade de dados maior. A correlação entre as matrizes de Cole-Rodgers e de Gower foi maior provavelmente porque existe maior quantidade de descritores qualitativos do que quantitativos quando comparamos com a correlação entre as matrizes de Mahalanobis com Gower.

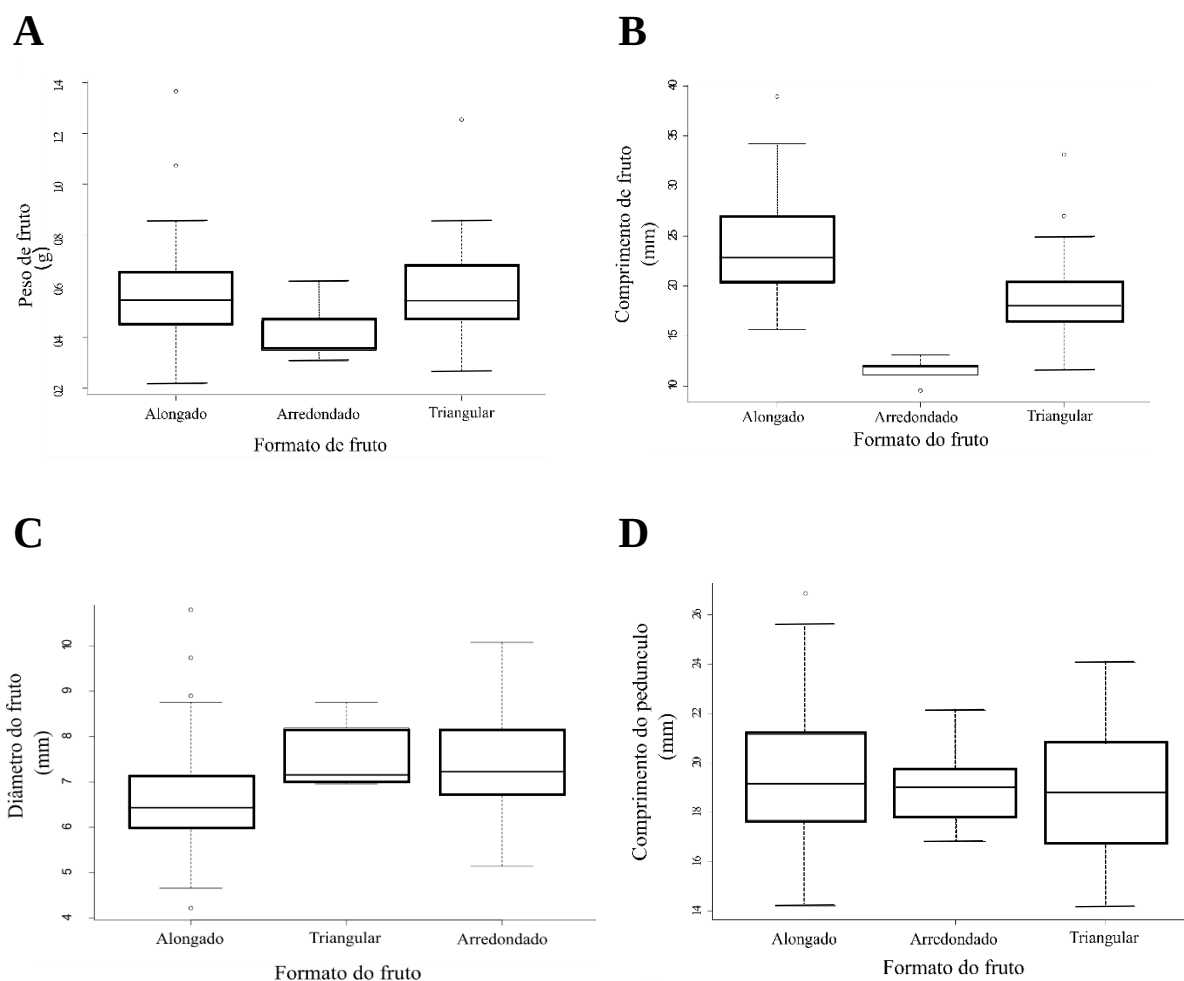


Figura 31. *Boxplot* dos valores mínimos, máximos e a mediana do peso dos frutos (A), Comprimento dos frutos (B), Diâmetro dos frutos (C) e Comprimento do pedúnculo (D) em relação ao formato dos frutos.

Tabela 21. Correlações entre as matrizes de dissimilaridade de Mahalanobis, Cole-Rodgerse Algoritmo de Gower obtida por descritores quantitativos e qualitativos em 163 genótipos de *Capsicum*.

Matrizes	Mahalanobis	Cole-Rodgers	Gower
Mahalanobis	-	0,14**	0,39**
Cole-Rodgers		-	0,87**
Gower			-

**Significativo a 1% pelo teste de Mantel (1000 permutações)

A matriz baseada no algoritmo de Gower apresentou maiores coeficientes de correlação cofenético (CCC) quando comparadas com as matrizes das variáveis separadas de Mahalanobis (quantitativos) e Cole-Rodgers (qualitativos) (Tabela

22). O algoritmo de Gower pode permitir maior eficiência no conhecimento da divergência entre acessos de bancos de germoplasma (Rocha et al., 2010). Segundo Mohammad e Prasanna (2003), quanto maior o CCC, menor será a distorção provocada ao agrupar os acessos. Portanto, o método hierárquico UPGMA assim como o uso da matriz com base no algoritmo de Gower foram os que mais bem explicaram a diversidade genética entre os acessos porque apresentou maior CCC.

Tabela 22. Coeficientes de correlação cofenético de diferentes métodos de agrupamento hierárquicos obtidos a partir de descritores qualitativos e quantitativos em 163 genótipos de *Capsicum*.

Agrupamentos	Matrizes de dissimilaridade		
	Mahalanobis	Cole-Rodgers	Gower
WARD	0,45	0,62	0,70
Vizinho mais próximo	0,46	0,29	0,68
UPGMA	0,58	0,71	0,76

Utilizando-se o algoritmo de Gower para análise conjunta de todos os descritores morfoagronômicos, identificou-se que os genótipos G93 e G95 foram os mais distantes, com magnitude 0,6450, enquanto o genótipo G77 e G159 foram os mais similares, com valor de 0,0034. A distância média observada entre os genótipos foi 0,2619. Interessante observar que os genótipos mais distantes, G93 e G95, pertencem aos grupos dos parentais UENF 1750 e UENF 2030, nessa ordem.

O agrupamento hierárquico UPGMA foi mais fidedigno do que os agrupamentos Ward e VMP, uma vez que comparativamente as inferências da correlação cofenética foram superiores, obtendo-se valores de 0,68, 0,70 e 0,76 para VPM, Ward e UPGMA e com base na matriz de Gower, respectivamente.

No dendrograma, obtido pelo método de agrupamento UPGMA, para a análise conjunta das variáveis quantitativas e qualitativas com base no algoritmo de Gower (1971) foi possível observar a formação de quatro grupos (Figura 32 e 32), com o corte estabelecido a aproximadamente 32% de dissimilaridade.

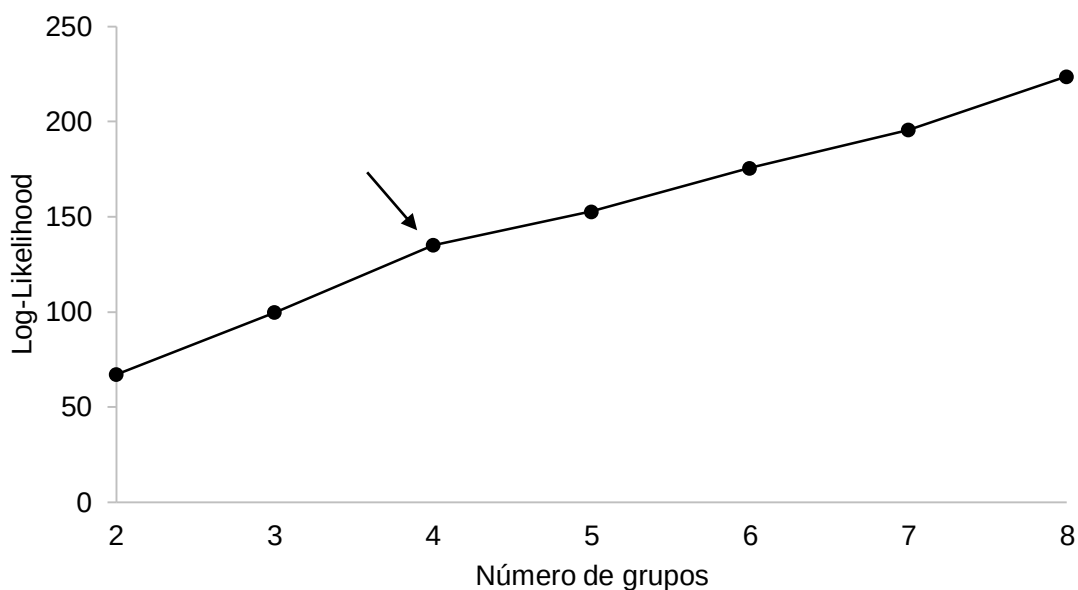


Figura 32. Gráfico da função logarítmica da probabilidade (Log-likelihood) em relação ao número de grupos formado para *C. annuum* var. *annuum* e *C. annuum* var. *glabriusculum* e seus híbridos interespecíficos F_2 .

O grupo I foi constituído por 31 genótipos sendo este o maior grupo. É composto pelo parental UENF 2030, e todas as outras combinações que, assim como ele, possuem três estádios de maturação do fruto (verde, laranja e vermelho) e corola de cor branca, anteras azuis claras, frutos eretos e flores eretas. São predominantemente alongados, porém, encontram-se seis genótipos com frutos triangulares (Gen20, 21, 30, 37, 45 e 153). Este grupo possui predominantemente plantas de hábito de crescimento intermediário. Nas características quantitativas, neste grupo observou-se ampla variabilidade na massa do fruto (variando de 0,26 a 1,37 g) e no comprimento do fruto com valores entre 17,12 a 34,24 mm, possuindo os frutos mais longos.

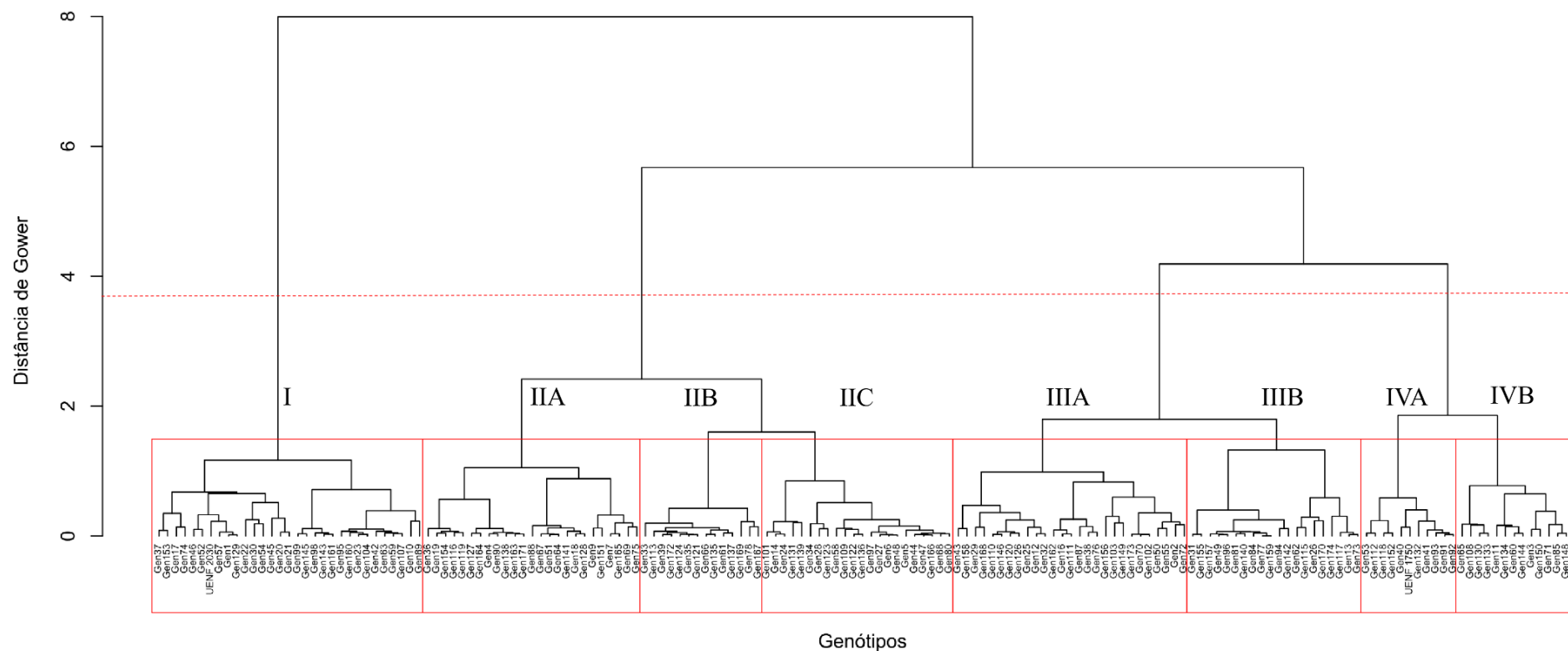


Figura 33. Dendrograma UPGMA de 163 acessos de *Capsicum annuum* utilizando-se a distância de Gower para as variáveis conjuntas (qualitativa + quantitativa). Campos dos Goytacazes, UENF, 2019.

O grupo IIA formado por 25 genótipos, qualitativamente são de hábito intermediário, possuem folhas verdes e verde-escuras, corola roxa ou branca com bordas roxa e predominantemente anteras roxas, flores e frutos eretos e persistentes. Os frutos são alongados com cinco estádios de maturação (verde, roxo escuro ou claro, verde ou amarelo, laranja e vermelho). O grupo IIB reúne 14 genótipos, com frutos alongados, com flores predominantemente eretas e de coloração branca com margem roxa, anteras azuis claras, com cinco estádios de maturação, com hábito de crescimento intermediário. Não há uma variação grande do peso do fruto, com média de 0,59 g. Sendo os frutos longos com medidas próximas do grupo I com média de 24,47 mm. O grupo IIC é constituído por 22 genótipos. Os frutos são alongados com exceção do Gen131 com formato triangular, possuem cinco estádios de maturação, flores eretas, predominantes corola branca com margem roxa, duas plantas com corola branca (Gen28 e 34) e uma roxa (Gen132), predominando anteras azuis claras, plantas de hábito de crescimento intermediários e eretas. Possuem uma variação no peso dos frutos de 0,26 a 1,07 g.

Grupo IIIA possui 27 genótipos. Frutos predominantemente triangulares, com exceção de um alongado (Gen 103) e um arredondado (Gen 156), com cinco estádios de maturação, hábito de crescimento intermediário, flores eretas, corola variando de branca com margem roxa, roxa e roxa com a base branca. Anteras azuis claro, roxas e azuis. Quantitativamente houve pouca variância no peso dos frutos (0,35 a 0,73 g) assim como no diâmetro (6,01 a 8,76 mm).

O grupo IIIB é formado por 20 genótipos, de frutos triangulares com exceção de dois genótipos arredondados (Gen 31 e 155) e um alongado (Gen 115), com cinco estádios de maturação. Flores eretas, predominando corola branca com margem roxa, uma roxa (Gen 170) e uma roxa com base branca (Gen 26). Predomina as anteras azuis claros, uma roxa (Gen174). Plantas de hábito de crescimento intermediários e eretas. Houve grande variância no peso dos frutos (0,35 a 1,26 g) e comprimento (11,11 a 33,14 mm).

O grupo IVA é o menor grupo, com 11 indivíduos, incluindo o genitor UENF 1750. Os frutos são triangulares com exceção do genótipo 132 sendo alongado e dois arredondados (UENF 1750 e genótipo 40). Flores eretas, predominante corola roxa e duas roxas com base branca (Gen 53 e 112) com predominância de anteras

roxas. Com cinco estádios de maturação. Hábito de crescimento intermediário e plantas eretas.

Grupo IVB, com 13 indivíduos, apresenta frutos de formatos alongados, com exceção de genótipos 11, 60, 134 e 144 que apresentam formatos triangulares. Com cinco estádios de maturação do fruto e com predominância do hábito de crescimento intermediário, a corola é roxa de base branca e as anteras são azuis claras ou roxas. Este grupo apresenta a menor variação de peso (0,31 a 0,68 g), diâmetro (16,83 a 24,98 mm) e comprimento (5,04 a 7,98 mm).

A análise conjunta das variáveis qualitativas e quantitativas possibilitou alocar os genótipos em um único dendrograma, fornecendo um melhor entendimento da variabilidade genética existente entre essas progênies.

Geralmente, as variáveis qualitativas são analisadas apenas por estatística descritiva. Isso ocorre porque, apesar das variáveis multicategóricas serem fáceis e rápidas de mensurar, quando as variáveis qualitativas são agrupadas após serem transformados em multicategóricos gera-se outro dendrograma, que muitas vezes discorda com os agrupamentos gerados pelas variáveis quantitativas, causando erros nas interpretações e dificultando a organização do banco de germoplasma (Cruz et al., 2014).

A caracterização das progênies baseada em descritores quantitativos e qualitativos, conjuntamente, possibilita uma interpretação fidedigna da variabilidade e divergência genética existente (Quintal et al., 2012; Buratto et al., 2015; Machado et al., 2015;). Assim, a ocorrência da grande diversidade de genótipos e a interpretação fidedigna da dissimilaridade genética permite direcionar os cruzamentos entre os genótipos de *Capsicum* em programa de melhoramento de pimentas ornamentais.

Verifica-se que os genótipos apresentam potencial para a ornamentação. Em que nenhum dos parentais ou combinações híbridas foi superior para todas as características tanto qualitativas quanto quantitativas avaliadas para o objetivo ornamental ao mesmo tempo. No entanto, com o objetivo de desenvolver novas cultivares para suprir as necessidades do mercado de pimentas para fins ornamentais deixa evidente o potencial destes híbridos para a seleção e produção de linhagens e cultivares. Principalmente quando se leva em consideração características como hábito de crescimento intermediário a ereto, número de estádios de maturação igual ou maior que três flores e frutos eretos, coloração da

corola roxa, branca com borda roxa e roxa com base branca, Destaca-se o potencial dos oito subgrupos para a sua utilização em programas de melhoramento visando a produção de cultivares de pimentas ornamentais (Figura 34; Figura 35).

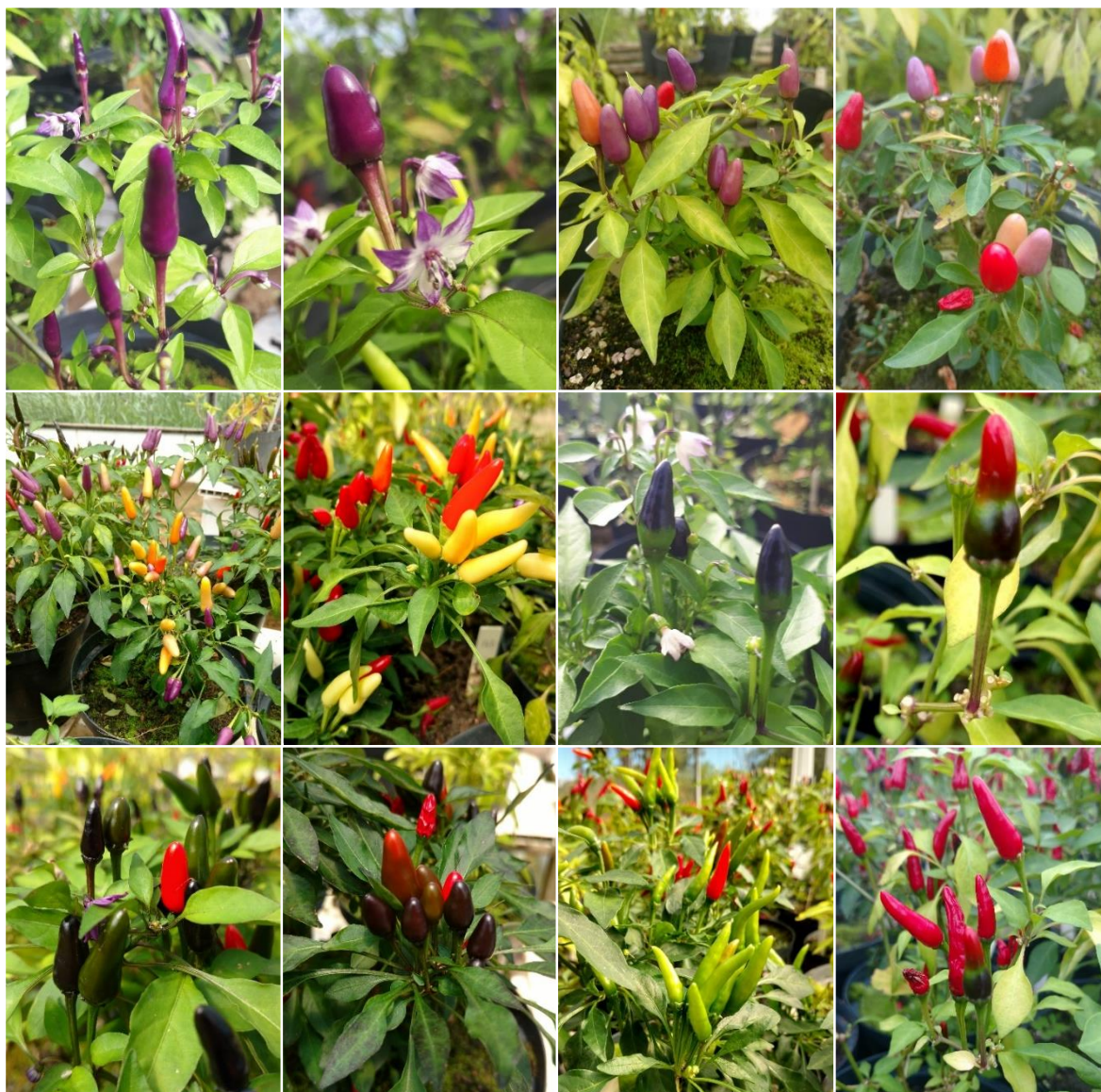


Figura 34. Aspecto geral da diversidade dos formatos e colorações dos frutos de pimenta ornamental da população segregante entre UENF 1750 x UENF 2030.



Figura 35. Aspecto geral da diversidade de flores de pimentas com potencial ornamental da população segregante entre UENF 1750 x UENF 2030.

3.3.4.2. Produção de duplo-haploides

3.3.4.2.1. Correlação entre o tamanho do botão floral e o estágio de desenvolvimento do micrósporo

Diferenças significativas foram observadas pelo teste F para nove das 10 características relacionadas à morfologia dos botões florais e do estágio do micrósporo. Apenas o comprimento da pétala (CP) não apresentou diferenças significativas (Tabela 23).

Com exceção ao CS (64,97%), CM (69,81%), DI (3,81%) e TE (8,84%), os valores de herdabilidade observados foram superiores a 80%, o que podemos considerar alto. O que indica que a maior parte da variabilidade total observada para esses caracteres se deve a diferenças genéticas entre eles (Vencovsky e Barriga, 1992). Os maiores valores para herdabilidade foram observados para GP (96,56%) e CA (96,07) (Tabela 23).

Tabela 23. Resumo da análise variância para a morfologia do botão floral e estágio de desenvolvimento dos micrósporos em híbridos de pimenta ornamental (UENF 1750 x UENF 2030).

FV	QM									
	CP	CS	DB	DA	CA	CM	DI	TE	UNI	GP
Trat	0,57**	0,62 ^{ns}	1,09**	0,09**	0,17**	46,60**	12,04**	3,45**	23,39**	285,14**
h^2 (%)	80,33	64,98	85,02	80,83	96,07	69,82	3,81	8,85	82,73	96,56
CV _g /CV _e	0,5	1,79	1,79	0,33	1,65	0,51	0,07	0,1	1,73	1,77
C.V. (%)	15,38	12,38	6,92	1,4	1,38	94,29	96,56	130,01	72,05	52,05

QM- Quadrado médio; h^2 - Herdabilidade; CV_g/CV_e- razão entre o coeficiente de variação genética e o coeficiente de variação ambiental; C.V.- Coeficiente de variação; FV- fonte de variância; CP- comprimento da pétala; CS- comprimento da sépala; DB- diâmetro do botão floral; DA- diâmetro da antera; CA- comprimento da antera; CM: número de células mãe do micrósporo; DI- número de micrósporos em díade; TE- número de micrósporos em tétrade; UNI- número de micrósporos uninucleados; GP- número de grãos de pólen.

Resultado similar foi encontrado por Barroso et al. (2015) também trabalhando com pimentas ornamentais (*C. annuum*). O número de micrósporos em TE também foi abaixo de 10%. No entanto, as DI tiveram resultados em torno de 70%. Assim com a maior h^2 para GP. Corroborando com o presente trabalho, comprovando que esta variável tem sua variabilidade devido a efeitos do genótipo.

A razão de coeficientes de variação genética e ambiental (CV_g/CV_e) foi maior que 1,0 para cinco das variáveis, CS, DB, CA, UNI e PG (Tabela 23), indicando uma situação favorável para seleção (Vencovsky, 1978). Como o principal interesse são os micrósporos UNI, este resultado é de grande importância, pois permite maior confiabilidade na seleção com base nesta característica. Barroso et al. (2015) obtiveram resultado em comum acima de 1,0 apenas para CS, mostrando que existem influências genéticas.

De todas as características morfológicas, apenas CS não obteve diferenças significativas (Tabela 23). Para CP, DB, DA e CA há uma tendência de que quanto maior a classe maior estas características serão.

A classe 1 apresenta as menores medidas, os botões apresentaram comprimento das pétalas de 1,59 mm, sendo estas menores que as sépalas com 1,72 mm. O diâmetro do botão foi de 1,71 mm. Apresentou as menores anteras, com diâmetro e comprimento de 0,34 e 0,72 mm, respectivamente (Tabela 24) (Figura 36A, D). Esta classe apresentou basicamente células mãe do micrósporo (CM). (Figura 36F).

Tabela 24. Média da morfologia do botão floral e estágio de desenvolvimento dos micrósporos em híbridos de pimenta ornamental (UENF 1750 x UENF 2030) divididos em três classes. Campos dos Goytacazes, 2019.

Classe	CP (mm)	CS (mm)	DB (mm)	DA (mm)	CA (mm)	CM	DI	TE	UNI	GP
1	1,59 b	1,72 a	1,71 c	0,34 c	0,72 c	400,53 a	15,67 a	12,13 b	7,93 c	0,00 c
2	1,83 ab	1,77 a	2,02 b	0,54 b	1,00 b	35,20 b	1,27 b	251,40 a	1095,4 a	12,07 b
3	1,97 a	1,79 a	2,25 a	0,72 a	1,32 a	2,13 c	0,07 b	17,13 b	24,47 b	1750,73 a

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). CP- comprimento da pétala; CS- comprimento da sépala; DB- diâmetro do botão floral; DA- diâmetro da antera; CA- comprimento da antera; CM: número de células mãe do micrósporo; DI- número de micrósporos em díade; TE- número de micrósporos em tétrade; UNI- número de micrósporos uninucleados; GP- número de grãos de pólen.

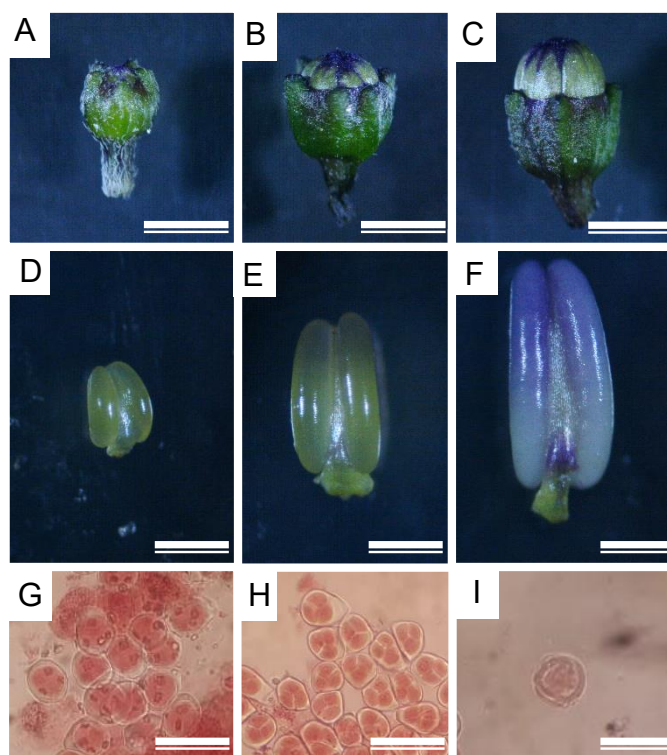


Figura 36. Relação entre as características morfológicas de gemas florais e estágio de desenvolvimento de micrósporos em híbridos de pimenta ornamental (UENF 1750 x UENF 2030) divididos em três classes. A-C) Aspecto do botão floral (bar= 2mm); A) Classe 1; B) Classe 2); C) Classe 3; D-F) Aspecto da antera (bar = 500 µm); D) Classe 1; E) Classe 2; F) Classe 3; G) Célula mãe do microsporo; H- Microsporo em tétrade; I- Microsporo uninucleado (bar = 25 µm).

Na segunda classe as pétalas e sépalas apresentaram comprimentos semelhantes, com 1,83 e 1,77 mm, respectivamente. O diâmetro do botão, diâmetro da antera e o comprimento da antera apresentaram valores intermediários, de 2,02, 0,54 e 1,00 mm, respectivamente. Nesta fase é possível verificar a presença de um grande número de micrósporos uninucleados, 1.095,4 microsporos uninucleados por antera (Tabela 24) (Figura 35 B, E, I).

Encontrar uma classe que concentra uma grande quantidade de micrósporos uninucleados é de grande importância, uma vez que os micrósporos nesta fase de desenvolvimento são os mais responsivos a cultura de anteras. Então conseguindo verificar uma maior quantidade de células nesta classe, de fácil identificação visual, facilita o manuseio e emprego da técnica no gênero *Capsicum*.

A terceira classe apresentou as maiores medidas, com pétalas maiores que sépalas, 1,97 e 1,79 mm, respectivamente. O mesmo foi observado para as anteras. Nesta classe é possível verificar uma grande presença de grãos de pólen, sendo este o de maior porcentagem nesta classe de botão floral (Tabela 24) (Figura 35C, F). Por esta razão, o uso de botões com pétalas maiores que sépalas não é indicado, justamente por possuírem uma grande concentração de grãos de pólen. O mesmo resultado foi encontrado por Barroso et al. (2015) com pimenta ornamental.

Características visíveis são possíveis de serem analisadas nas anteras dos botões florais de alguns genótipos, principalmente aqueles com coloração roxa das pétalas e anteras (Figura 35F). Esta alteração de coloração é encontrada na classe 3, podendo ser usada como indicativo para esta fase (Figura 35D-F).

As características morfológicas apresentaram correlação positiva com as classes de crescimento do botão, o que valida a eficiência dos parâmetros usados para separar as classes de botão floral (Tabela 25). Então, quanto maior a classe do botão floral maior serão suas características morfológicas, como comprimento da pétala, sépala e antera, diâmetro do botão e antera.

Verificou-se também uma correlação negativa entre as classes de botões florais com CM, TE e DI, ou seja, com o aumento do tamanho do botão floral o número de micrósporos nestes estádios decresce (Tabela 22), pois vão atingindo a maturação até se tornarem grãos de pólen. Observou-se uma correlação positiva entre as classes e a quantidade de grãos de pólen.

Não houve correlação de nenhuma variável com micrósporos uninucleados, o que indica uma concentração deste estágio de desenvolvimento em uma determinada classe (Tabela 25). O que realmente é observado, a classe 2 apresenta a maior concentração de micrósporos nesta fase de desenvolvimento (Tabela 24).

Assim, é possível determinar o tamanho ideal do botão floral para encontrar a maior quantidade de micrósporos no estágio uninucleado. Para isso, tamanhos aproximados de pétalas e sépalas podem ser usados como padrões para a determinação da coleta das anteras. Vários autores descrevem a existência de uma relação entre o tamanho das pétalas e sépalas e o estágio de desenvolvimento do micrósporo. Barroso et al. (2015), descrevem uma maior concentração de micrósporos uninucleados em botões com sépalas e pétalas do mesmo tamanho. Sibi et al. (1979) e Nowaczyk e Kisiala (2006) descrevem botões com pétalas de comprimento igual ou ligeiramente maiores que as sépalas contendo micrósporos no estágio inicial de binucleação e uninucleados. Lantos et al. (2009) identificou 80% de micrósporos uninucleados em anteras extraídas de botões com pétalas com comprimento ligeiramente maior que o das sépalas.

Tabela 25. Correlação entre as variáveis relacionadas à morfologia do botão floral e ao estágio de desenvolvimento do micrósporo em botões florais de pimentas ornamentais de população segregante entre *Capsicum annuum* var. *glabriusculum* (UENF 1750) x *C. annuum* var. *annuum* (UENF 2030). Campos dos Goytacazes, 2019.

	Classe	CP	CS	DB	DA	CA	CM	DI	TE	UNI	GP
Classe	1	0,9887 ^{ns}	0,9707 ^{**}	0,9964 ^{**}	0,9995 ^{**}	0,9993 ^{**}	-0,9010 ^{**}	-0,8985 ^{**}	0,0183 ^{ns}	0,0133 ^{**}	0,8690 ^{ns}
CP		1	0,9958 ^{ns}	0,9979 ^{ns}	0,9928 ^{ns}	0,9821 ^{ns}	-0,9559 ^{ns}	-0,9543 ^{ns}	0,1683 ^{ns}	0,1633 ^{ns}	0,7848 ^{ns}
CS			1	0,9877 ^{ns}	0,9776 ^{**}	0,9608 ^{ns}	-0,9788 ^{ns}	-0,9776 ^{ns}	0,2579 ^{ns}	0,2531 ^{ns}	0,7247 ^{ns}
DB				1	0,9985 ^{ns}	0,9923 ^{ns}	-0,9347 ^{ns}	-0,9327 ^{ns}	0,1034 ^{ns}	0,0984 ^{ns}	0,8237 ^{ns}
DA					1	0,9976 ^{ns}	-0,9138 ^{ns}	-0,9114 ^{ns}	0,0486 ^{ns}	0,0436 ^{ns}	0,8536 ^{ns}
CA						1	-0,8836 ^{ns}	-0,8810 ^{ns}	-0,0202 ^{ns}	-0,0252 ^{ns}	0,8874 ^{ns}
CM							1	1,0000 ^{ns}	-0,4502 ^{ns}	-0,4458 ^{ns}	-0,5683 ^{ns}
DY								1	-0,4553 ^{ns}	-0,4508 ^{ns}	-0,5636 ^{ns}
TE									1	0,1000 ^{ns}	-0,4788 ^{ns}
UNI										1	-0,4832 ^{ns}
GP											1

^{ns}, ^{**} e ^{*} : não significativo, significativo a 1 e 5% de probabilidade pelo teste t, respectivamente. CP- comprimento da pétala; CS- comprimento da pétala; DB- diâmetro do botão floral; DA- diâmetro da antera; CA- comprimento da antera; CM: número de células mãe do micrósporo; DI- número de micrósporos em díade; TE- número de micrósporos em tétrade; UNI- número de micrósporos uninucleados; GP- número de grãos de pólen.

3.3.4.2.2. Indução de embriogênese via cultura de anteras

Os protocolos dos meios de cultura utilizados para indução da embriogênese por meio da cultura de anteras não foram eficientes. As anteras dos genótipos utilizados não apresentaram diferenciação dos tecidos.

Barroso et al. (2015) utilizando protocolos semelhantes conseguiram obter 36% de calos embriogênicos em anteras de pimentas ornamentais, em meio M1 e M4. O meio M1 foi o mais eficiente na indução de calos em sete genótipos, no entanto neste mesmo meio outros dois genótipos apresentaram apenas 0,5% de calos embriogênicos.

O genótipo é o fator mais importante e muitas vezes o mais limitante na resposta de *Capsicum* à androgênese, e este fator foi estudado por vários autores (Rodeva et al., 2004; Koleva-Gudeva et al., 2007; Irikova et al., 2011; Barroso et al., 2015).

Assim, outros acessos de *Capsicum* devem ser estudados, com a finalidade de encontrar genótipos responsivos a androgênese. Uma alternativa para tentar superar o problema de não responderem ao cultivo de anteras é a hibridação com genótipos altamente responsivos, transferindo os genes que determinam a resposta androgênica para acessos que são de interesse aos programas de melhoramento. Além de buscar e melhorar os protocolos, estudando fatores como pré-tratamentos a frio, fotoperíodos, fitorreguladores e protocolos para cultura de micrósporos dentre outros (Barroso et al., 2015).

3.3.5. CONCLUSÕES

As plantas F₂ de pimenta, derivadas do cruzamento entre acessos da coleção de germoplasma da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), apresentaram variabilidade para os caracteres analisados.

O algoritmo de Gower foi eficiente na separação das progênies avaliadas. A análise conjunta de descritores qualitativos e quantitativos permitiu maior eficiência no conhecimento da divergência existente entre as progênies de *Capsicum* quando

comparadas com as análises realizadas separadamente das variáveis qualitativas e quantitativas.

A relação do tamanho entre sépalas e pétalas pode ser usado para facilitar a identificação da maior concentração de células uninucleadas, ideais para a cultura de anteras e conversão em duplo-haploides.

O genótipo é de grande influência na resposta androgênica da cultura de anteras. Os genótipos testados não apresentaram potencial para a formação de calos embriogênicos em nenhum dos protocolos testados.

4. CONCLUSÃO GERAL

Os resultados obtidos neste trabalho oferecem soluções eficientes para contornar algumas dificuldades frequentemente encontradas em programas de melhoramento genético de *Capsicum*, como a possibilidade de resgate de embriões *in vitro* de cruzamentos incompatíveis, viabilizando o desenvolvimento de novas cultivares. Também definiu as condições ambientais mais eficientes em promover o crescimento *in vitro* de plantas de *C. annuum*. E, finalmente, verificou a existência de uma grande variabilidade em genótipos de uma população segregante com potencial para a ornamentação, possibilitando a continuidade deste programa de melhoramento para a obtenção de linhagens e cultivares ornamentais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abud, H.F., Araújo, E.F., Araujo, R.F., Picoli, E.A.D.T., Gallão, M.I. (2017) Histochemical changes during the ontogeny of malagueta and biquinho pepper seeds. *Acta Scientiarum, Agronomy*, 39 (4):535-343.
- Abud, H.F. (2013) *Caracterização de frutos, histoquímica e qualidade fisiológica de sementes de pimenta durante a maturação*. Tese (Doutorado em Fitotecnia), Viçosa, MG, Universidade Federal de Viçosa, 93p.
- Afreen, F., Zobayed, S. M. A., Kozai, T. (2002) Photoautotrophic culture of *Coffea arabusta* somatic embryos: photosynthetic ability and growth of different stage embryos. *Annals of Botany*, 90:11-19.
- Ahmed, E.A., Daubeze, A.M., Lafortune, D., Idepestre, T., Nono-Womdim, R., Duranton, C., Berke, T., Gaddagimath, N.B., Nemouchi, G., Phaly, T., Palloix, A. (2001) Constructing multiresistant genotypes of sweet pepper for cultivation in the tropics. In: *XIth EUCARPIA Meeting on Genetics and Breeding of Capsicum and Eggplant*. Antalya (Turquie), p. 293-297.
- Albany, N.R., Vilchez, J.A., Garcia, L., Jimenez, E. (2005) Comparative study of morphological parameters of Grand Nain banana (*Musa AAA*) after *in vitro* multiplication with growth retardants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, 83:357-361.

- Allard, R.W. (1971) *Princípios do melhoramento genético das plantas*. São Paulo: Edgard Blüchner, 381p.
- Alvarez, C., Saez, P., Saez, K, Sanchez - Olate, M. Rios, D. (2012) Effects of light and ventilation on physiological parameters during *in vitro* acclimatization of *Gevuina avellana* mol. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 110:93-101.
- Aragón, C., Carvalho, L., González, J., Escalona, M., Amâncio, M. (2010) *Ex vitro* acclimatization of plantain plantlets micropropagated in temporary immersion bioreactor. *Biologia Plantarum*, 54:237-244.
- Bapa Rao, N., Sri Valli, T., Lakshmi, N. (1992) Cytogenetic studies on the interspecific hybrid *Capsicum baccatum* L, *C. frutescens* L. and its progeny. *Euphytica*, 59:135-140.
- Barbieri, R.L., Neitzke, R.S. (2008) Pimentas do gênero *Capsicum* – cor, fogo e sabor. In: Barbieri, R. L., Stumpf, E. R. T. Origem e evolução de plantas cultivadas. Brasília: *Embrapa Informação Tecnológica*, p. 727-745.
- Barbosa, R.R.N. (2016) *Cultivo in vitro de pimenta malagueta em frascos com ventilação natural: respostas mixotróficas e fotoautotróficas*. Tese (Mestrado em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, 65p.
- Barroso, P.A., Rêgo, E.R., Rêgo, M.M., Nascimento, K.S., Nascimento, N.F.F., Nascimento, M.F., Soares, W.S., Ferreira, K.T.C., Otoni, W.C. (2012) Analysis of segregating generation for components of seedling and plant height of pepper (*Capsicum annuum* L.) for medicinal and ornamental purposes, *Acta Horticulturae*, 953:269-276.
- Barroso, P.A., Rêgo, M.M., Rêgo, E.R., Soares, W.S. (2015) Embryogenesis in the anthers of different ornamental pepper (*Capsicum annuum* L.) genotypes. *Genetics and Molecular Research*, 14(4):13349-13363.
- Barrueto Cid, L.P.A. (2001) Propagação *in vitro* de plantas. O que é isto?. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, Brasília, 3(19):16-21.

- Batista, D.S., Dias, L.L.C., Rêgo, M.M., Saldanha, C.W., Otoni, W.C. (2017) Flask sealing on *in vitro* seed germination and morphogenesis of two types of ornamental pepper explants. *Ciência Rural*, 47(3):1-6.
- Batista, D.S. (2012) *Influência de trocas gasosas, do etileno e de poliaminas na morfogênese in vitro de pimenteira ornamental (Capsicum annuum L.)* Tese (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Viçosa – MG, Universidade Federal de Viçosa – UFV, 63p.
- Benson, E.E. (2000) Special symposium: *In vitro* plant recalcitrance do free radicals have a role in plant tissue culture recalcitrance?, *In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 36:163–170.
- Bianchetti, L.B., Carvalho, S.I.C. (2005) Subsídios à coleta de germoplasma de espécies de pimentas e pimentões do gênero *Capsicum* (Solanaceae). In: Walter, B. M. T., Cavalcanti, T. B. *Fundamentos para a coleta de germoplasma vegetal: teoria e prática*. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, p. 355-385.
- Borém, A., Miranda, G.V. (2013) *Melhoramento de Plantas*. 6. ed. Viçosa: Editora UFV, 523p.
- Bosland, P.W. (1996) *Capsicums*: Innovative uses of an ancient crop. In: J. Janick (ed.), *Progress in new crops*. ASHS Press, Arlington, VA. p. 479-487.
- Bosland, P.W., Gonzalez, M.M. (1994) 'NuMex Mirasol' Chile. *HortScience* 29(9):1091.
- Brasil. (2009) *Regras para Análise de Sementes*. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária, Brasília, MAPA/ACS, 395p.
- Buratto, J.S., Santos Neto, J., Moda-Cirino, V. (2015) Desempenho agrônômico e dissimilaridade genética entre acessos de amendoim por variáveis multicategóricas. *Scientia Agraria Paranaensis*, 15(3):324-331.
- Buso. G.S.C., Lourenco. R.T., Bianchetti. L.B., Lins. T.C.L., Pozzobon. M.T., Amaral. Z.P.S., Ferreira. M.E. (2001) Espécies silvestres do gênero *Capsicum* coletadas na Mata Atlântica Brasileira e sua relação genética com espécies

cultivadas de pimenta: uma primeira abordagem genética utilizando marcadores moleculares, Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, (Boletim de pesquisa e desenvolvimento), 22p.

Büttow, M.V., Barbieri, R.L., Neitzke, R.S., Heiden, G., Carvalho, F.I.F. (2010) Diversidade genética entre acessos de pimentas e pimentões da Embrapa Clima Temperado, *Ciência Rural*, 40(6):1264-1269.

Calvete, E.O., Azevedo, M., Bordini, M.H., Suzin, M. (2002) Análises anatômicas e da biomassa em plantas de morangueiro cultivadas *in vitro* e ex vitro. *Horticultura Brasileira*, Brasília, 20(4):649-653.

Campos, K.P. (2006). *Obtenção, caracterização molecular, morfológica e reprodutiva de híbridos entre espécies de Capsicum*. Tese (Doutorado em Produção Gevetal), Campos dos Goytacazes, RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 145p.

Capellades, M., Fontarnau, R., Carulla, C., Debergh, P. (1990) Environment influences anatomy of stomata and epidermical cells in tissue-cultured *Rosa multiflora*. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 115:141-145.

Capellades, M., Lemeur, R., Derbergh, P. (1991) Effects of sucrose on starch accumulation and rate of photosynthesis in *rosa* cultured *in vitro*. *Plant cell tissue organ Cult.* 25:21-26.

Carrizo, G.C., Sterpetti, M., Volpi, P., Ummarino, M., Saccardo, F. (2013) Wild *Capsicums*: identification and *in situ* analysis of Brazilian species. *XVth EUCARPIA Meeting on genetics and breeding of Capsicum and Eggplant*. Torino, Italy. p. 205-213.

Carvalho, A.C.P.P., Torres, A.C., Braga, E.A.B., Lemos, E.E.P., Souza, F.V.D., Peter, J.A., Willadino, L., Câmara, T.R. (2011) Glossário de cultura de tecidos de plantas. *Plant cell culture e micropropagation*, 7:30-60.

Carvalho, S.D., Bianchetti, L.D.B., Ribeiro, C.D.C., Lopes, C.A. (2006). Pimentas do gênero *Capsicum* no Brasil. *Brasília: Embrapa Hortaliças*. 15p.

- Carvalho, S.I.C., Bianchetti, L.B. (2008) Botânica e recursos genéticos. in: ribeiro, C.S.C., Lopes, C.A., Carvalho, S. I. C., Henz, G.P., Reifschneider, F.J.B. *Pimentas Capsicum*. Brasília: Embrapa Hortaliças. p. 39-53.
- Carvalho, S.I.C., Bianchetti, L.B., Bustamante, P.G., Silva, D.B. (2003) *Catálogo de germoplasma de pimentas e pimentões (Capsicum spp.) da Embrapa Hortaliças*. Brasília, 38 DF: Embrapa Hortaliças. 49p.
- Castellani, E.D., Damião Filho, C.F., Aguiar, I.B. De, Paula. R.C. De. (2008), Morfologia de frutos e sementes de espécies arbóreas do gênero *Solanum* L, *Revista Brasileira de Sementes*, 30 (1):102–113.
- Chamberlain, C.J. (1932) *Methods in plant histology*. Chicago: The University of Chicago Press, 5.ed, 444p.
- Chamovitz, D.A., Deng, X-W. (1996) Light signaling in plants. *Critical Reviews in Plant Science*. 15:455-478.
- Chandra, S., Bandopadhyay, R., Kumar, V., Chandra, R. (2010) Acclimatization of tissue cultured plantlets: from laboratory to land. *Biotechnology Letters* 32:1199-1205.
- Charlo, H.C.O., Castoldi, R., Fernandes, C., Vargas, P.F., Braz, L.T. (2009) Cultivo de híbridos de pimentão amarelo em fibra da casca de coco, *Horticultura Brasileira*, 27:155-159,
- Charlo, H.C.O., Galatti, F.D.S., Braz, L.T., Barbosa, J.C. (2011). Híbridos experimentais de melão rendilhado cultivados em solo e substrato. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 33:144-156.
- Cha-Um, S., Ulziibat, B., Kirdmanee, C. (2010) Effects of temperature and relative humidity during *in vitro* acclimatization, on physiological changes and growth characters of *Phalaenopsis* adapted to *in vivo*. *Australian Journal of Crop Science*, 4:750-756.
- Chen, P., Lott, J.N.A., (1992) Studies of *Capsicum annuum* seeds: structure, storage reserves, and mineral nutrients, *Canadian Journal of Botany*, 70:518 – 529.

- Coelho, V.A.T., Figueiredo, M.A., Rodas, C.L., Bastos, A.R.R., Coelho, L.C., de Carvalho, J.G. (2014) Nutrição mineral de pimenta ornamental sob deficiências nutricionais. *Nucleus*, 11 (1):169-178.
- Cole-Rodgers, P., Smith, D.W., Bosland, P.W. (1997) A novel statistical approach to analyze genetic resource evaluations using *Capsicum* as an example. *Crop Science*, 37:1000-1002.
- Costa, D.A. (2012) *Aspectos fisiológicos da cana-de-açúcar sob o cultivo in vitro em diferentes microambientes*. Tese (Doutorado em Botânica) – Recife – PE, Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, 82p.
- Costa, L.V., Lopes, R., Lopes, M.T.G., Figueiredo, A.F.F., Barros, W.S., ALVES, S.R.M. (2009) Cross compatibility of domesticated hot pepper and cultivated sweet pepper. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 9:37-44.
- Couceiro, M.A., Afreen, F., Zobayed, S.M.A., Kozai, T. (2006) Enhanced growth and quality of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) under photoautotrophic *in vitro* conditions. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 42:278-282.
- Couto, T.R. (2012) *Avaliação de genótipos de abacaxizeiro cultivados in vitro e ex vitro: eficiência fotossintética, crescimento e relações hídricas*. Tese (Mestrado Genética e Melhoramento de Plantas) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 132p.
- Cruz, C.D., Carneiro, P.C.S., Regazzi, A.J. (2014), Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético, 3. ed. Viçosa: UFV. 2:668p.
- Cruz, C.D., Regazzi, A.J. (2001) Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. UFV. 390p.
- Cruz, D.C. (2013) GENES - A software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. *Acta Scientiarum Agronomy*, 35:271-276.
- Cui, Y., Hahn, E., Kozai, T., Paek, K., Cui, Y, Hahn, E. J., Paek, K. (2000) Number of air exchanges, saccharose concentration, photosynthetic fóton flux, and differences in photoperiod and dark period temperatures affect growth of *Rehmannia glutinosa* plantas *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 62 (3):219-226.

- Custers, J.B.M., Snepvangers, S.C.H.L., Jansen, H.J., Zhang, L., Van Lookeren Campagne, M.M. (1999) The 35S-CaMV promoter is silent during early embryogenesis but activated during nonembryogenic sporophytic development in microspore culture. *Protoplasma*, 208:257–264.
- Da Cunha, M., Gomes, V.M., Xavier Filho, J., Attias, M., Souza, W., Miguens, F.C. (2000) Laticifer system of *Chamaesyce thymifolia*, A closed host environment for Trypanosomatids. *Biocell*, 24:123-132,
- Daher, R.F., Pereira, M.G., Tupinamba, E.A., Amaral Júnior, A.T., Aragão, W.N., Ribeiro, F.E., Oliveira, L.O., Sakiyama, N.S. (2002) Assessment of coconut tree genetic divergence by compound sample RAPD marker analysis. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 3:431-438,
- Davey, M.R., Anthony, P. (2010) *Plant cell culture: essential methods*. Print Media. 341p.
- David, R., Carde, J.P. (1964) Coloration différentielle des inclusions lipidique et terpeniques des pseudophylles du *Pin maritime* au moyen du reactif Nadi. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences D*, 258:1338-1340.
- Debbarama, C., Khanna, V., Tyagi, W., Rai, M., Meetei, N., (2013) Wide Hybridization and Embryo-Rescue for Crop Improvement in *Capsicum*. *Agrotechnology*, 003 (6):1-6.
- Decchetti, S.F.C., Soares, A.M., Paiva, R., Castro, E.M. (2008) Effect of the culture environment on stomatal features, epidermal cells and water loss of micropropagated *Annona glabra* L. plants. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, 117:341-344.
- Dias, G.B., Gomes, V.M., Moraes, T.M.S., Zottich, U.P., Rabelo, G.R., Carvalho, A.O., Moulin, M., Gonçalves, L.S.A., Rodrigues, R., Da Cunha, M. (2013) Characterization of *Capsicum* species using anatomical and molecular data. *Genetics and Molecular Research*, 12(4):6488–6501.
- Dolcet-Sanjuan, R., Claveria, E., Huerta, A. (1997) Androgenesis in *Capsicum annum* L. Effects of carbohydrate and carbon dioxide enrichment. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 122 (4):468–475.

- Dolezel, J., Bartos, J. (2005) Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. *Annals of Botany*, 95:99–110.
- Doyle, J.J., Doyle, J.L., (1987) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12:13-15.
- Dubé, S.L. E Vidaver, W. (1992) Photosynthetic competence of plantlets grow *in vitro*. An automated system for measurement of photosynthesis *in vitro*. *Physiologia Plantarum*, 84:409-416.
- Dumas de Vaulx, R., Chambonnet, D., Pochard, E. (1981) Culture *in vitro* d'anthères de piment (*Capsicum annuum* L.) amélioration des taux d'obtention de plantes chez différents génotypes par des traitements á +35°C. *Agronomie* 1:859–864.
- EMBRAPA, (2012) *Hortalças em número. Produção de hortalças no Brasil*: http://www.cnph.embrapa.br/paginas/hortalicas_em_numeros/producao_hortalicas_brasil_2000_2011.pdf em: 05/11/2014.
- Embrapa. (2007) *Brasil, comércio internacional de hortalças*: http://www.cnph.embrapa.br/paginas/hortalicas_em_numeros/comercio_internacional_hortalicas_2000_2007.pdf
- Erig, A.C., Schuch, M. W. (2005) Photoautotrophic micropropagation and use of the natural light. *Ciência Rural*. Santa Maria – RS, p. 961-965.
- Evanno, G., Regnaut, S., Goudet, J. (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study, *Molecular Ecology*, 14:2611-2620.
- Ezura, H., Nishimiya, S., Kasumi, M. (1993) Efficient regeneration of plants independent of exogenous growth regulators in bell pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Cell Reports*. 12:676- 680.
- Fabri, E.G. (2008) *Pimenta. Globo Rural*. 279. Editora Globo.
- FAOSTAT. (2015) *FAO (Food and Agricultural Organizations of the United Nations)*. Versão eletrônica. Disponível em: < <http://faostat3.fao.org/faostatgateway/go/to/download/Q/QV/E> >. Acesso em 12 fev, 2019.

- Fári, M., Andrasfalvy, A. (1994) Regeneration and cloning of pepper (*Capsicum* sp.) *in vitro*: A review. *Horticultural Science* (Hungary), 26:9–18
- Feder, N., O'Brien, T.P. (1968) Plant microtechnique: some principles and new methods. *American Journal of Botany*, 55:123–142.
- Ferreira, D.F. (2011) Sisvar: A computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia*, 35:1039-1042.
- Ferrie, A.M.R., Caswell, K.L. (2011) Isolated microspore culture techniques and recent progress for haploid and doubled haploid plant production. *Plant Cell Tissue Organ Culture*. 104:301-309.
- Ferrie, A.M.R., Irmen, K.I., Beattie, A.D., Rossnagel, B.G. (2014) Isolated microspore culture of oat (*Avena sativa* L.). for the production of doubled haploids: effects of preculture and post-culture conditions. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 116:89-96.
- Filgueira, F.A.R. (2012) *Novo Manual de Olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças*. Viçosa- MG: UFV. 402p.
- Filho, W.B., Pereira A.M.S., França, S.C., Furlan, M. (2002) Indução de Metabólitos Bioativos em Culturas de Células de *Maytenus ilicifolia*. *Eclética Química*. São Paulo. 27 (especial): p. 403-416.
- Fischer, D.B. (1968) Protein Staining Of Ribbonded Epon Sections For Light Microscopy. *Histochemie*, 16:92-96.
- Floss, E.L. (2003) Estratégias De Pós-Melhoramento. II Congresso Brasileiro De Melhoramento De Plantas. Porto Seguro-BA, Anais.
- Ganter, P., Jollés, G. (1969, 1970) Histologie Normale Et Pathologique. *Gauthier-Villars*, 1 (2):1904p.
- Genoud, C., Coudret, A., Amalric, C., Sallanon, H. (1999) Effects of micropropagation conditions of rose shootlets on chlorophyll fluorescence. *Photosynthetica*, 36(1-2):243-251.
- Germanà, M.A. (2011) Anther Culture For Haploid And Doubled Haploid Production. *Plant Cell Tissue Organ Culture*. 104:283-300.

- Godoy, M.C., Godoy, A.R, Cardoso, A.I.I. (2006) *Influência Do Estádio De Maturação Da Flor Na Produção De Sementes De Pimentão Com Polinização Manual*. Bragantia, Campinas, 65:83-87.
- Gower, J.C. (1971) A general coefficient of similarity and some of its properties. *Biometrics*. Hoboken, 27:857-874.
- Grattapaglia, D., Machado, M.A. Micropropagação. In: Torres, C.A., Caldas, L.S. *Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas*. Brasília. ABCTP/EMBRAPA-CNPH, 1990, p. 99-169.
- Guimarães, C.T., Moreira, M.A. (1999) Genética molecular aplicada ao melhoramento de plantas. In: Borém, A. (Ed.), *Melhoramento de espécies cultivadas*. Viçosa: UFV. p. 715-740.
- Hahn, E., Paek, K., Hahn, E., Paek, K. (2001) High photosynthetic foton flux and high CO₂ concentration under increased number of air exchanges promote growth and photosynthesis of four kinds of orchid plantlets *in vitro*. *In vitro Celular and Developmental Biology Plant*. 37 (5):678-682.
- Hajjar, R., Hodgkin, T. (2007) The use of wild relatives in crop improvement: a survey of developments over the last 20 years. *Euphytica*, 156 (1-2):1–13.
- Harlan, J.R., De Wet, J.M.J. (1971) Toward a rational classification of cultivated plants. *Taxon*, 20: 509-517.
- Hazarika, B.N. (2006) Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. *Scientia Horticulturae*, 108:105-120.
- Hazarika, B.N. (2003) Acclimatization of tissue-cultured plants. *Current Science*, Bangalore, 85 (12):1704-1712.
- Hdider, C., Desjardins, Y. (1994) Effects of sucrose on photosynthesis and phosphoenolpyruvate carboxylase activity of *in vitro* cultured strawberry plantlets. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 36:27-33.
- Hossain, A., Minami, M., Nemoto, K. (2003) Immature embryo culture and interspecific hybridization between *Capsicum annuum* L. and *C. futescens* L. via embryo rescue. *Journal of Tropical Agriculture*, 47 (1):9–16.

- Hossain, M.A., Minami, M., Nemoto, K. (2003) Immature embryo culture and interspecific hybridization between *Capsicum annuum* L, and *C. frutescens* L, via embryo rescuel. *Japan Journal of Tropical Agriculture*, 47:9–16.
- Iarema, L., Cruz, A. C.F., Saldanha, C.W., Dias, L.L.C., Vieira, R.F., Oliveira, E.J., Otoni, W.C. (2012) Photoautotrophic propagation of Brazilian ginseng. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 110:227–238.
- IBPGR (1983) *Genetic resources of Capsicum*. Rome: IBPGR, 49p.
- IPGRI. (1995) *Descriptores para Capsicum (Capsicum spp.)*. Roma. IPGRI, 51p.
- Irikova, T., Grozeva, S., Popov, P., Rodeva, V. (2011a) *In vitro* response of pepper anther culture (*Capsicum annuum* L.) depending on genotype, nutrient medium and duration of cultivation. *Biotechnol. Eq.* 25:2604-2609.
- Irikova, T., Grozeva, S., Rodeva, V. (2011b) Anther culture in pepper (*Capsicum annuum* L.) *in vitro*. *Acta Physiology Plant Journal*, 33:1559-1570.
- Ishikawa, K., Janos, T., Sakamoto, S., Nunomura, O. (1998) The contents of capsaicinoids and their phenolic intermediates in the various tissues of the plants of *Capsicum annuum* L. *Capsicum and Eggplant Newsletter*, 17:22-25.
- Ivanova, M., Van Staden, J. (2010) Natural ventilation effectively reduces hyperhydricity in shoot cultures of *Aloe polyphylla* Schönland ex Pillans. *Plant Growth Regulation*, 60:143–150.
- Jansky, S. (2006) Overcoming hybridization barriers in potato. *Plant Breeding*, 125:1–12.
- Johansen, D.A. (1940) *Plant microtechnique*. McGraw Hill Book.
- Johansson, L., Andersson, B., Ericsson, T. (1982) Improvement of anther culture technique: activated charcoal bound in agar medium in combination with liquid medium and elevated CO₂ concentration. *Physiol Plantarum*, 54:24–30.
- Jordy, M.N. (2004) Seasonal variation of organogenetic activity and reserves allocation in the shoot apex of *Pinus pinaster* Ait. *Annals of Botany*, 93:25-37.

- Kadlecek, P., Tichá, I., Haisel, D., Capková, V., Schafer, C. (2001) Importance of *in vitro* pretreatment for ex vitro acclimatization and growth. *Plant Science*, 161:695-701.
- Karuppanapandian, T., Moon, J.C., Kim, C., Manoharan, K., Kim, W. (2011) Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. *Australian Journal of Crop Science*, 5 (6):709-725.
- Khan, H., Siddique, I., Anis, M. (2006) Thidiazuron induced somatic embryogenesis and plant regeneration in *Capsicum annuum*. *Biologia Plantarum*. 50:789-792.
- Kim, M., Park, E.J., An, D., Lee, Y. (2013) High-quality embryo production and plant regeneration using a two-step culture system in isolated microspore cultures of hot pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 112 (2):191–201.
- Klein, D.E., Gomes, V.M., Da Silva-Neto, S.J., Da Cunha, M. (2004) The structure of colleters in several species of Simira (Rubiaceae). *Annals of Botany*, 94:733–740.
- Kodym, A., Zapata-Arias, F.J. (1999) Natural light as an alternative light source for the *in vitro* culture of banana (*Musa acuminata* cv. Grande Naine). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 55:141-145.
- Koleva-Gudeva, L., Spasenovski, M., Trajkova, F. (2007) Somatic embryogenesis in pepper anther culture: the effect of incubation treatments and different media. *Scientia Horticulturae*, 111:114-119.
- Kothari, S.L., Joshi, A., Kachhwaha, S., Ochoa-Alejo, N. (2010) Chilli peppers-a review on tissue culture and transgenesis. *Biotechnology Advances*, 28:35–48.
- Kovalchuk, I. (2010) *Multiple roles of radicals in plants. Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants*. Enfield, Science Publishers, p. 31-44.
- Kozai, T. (1991) Micropropagation under photoautotrophic conditions. In: Debergh, P. C., Zimmerman, T. H. *Micropropagation technology and application*. Kluwer Academic Publishers, p. 447–469.

- Kozai, T., Afreen, F., Zobayed S.M.A. (2005) *Photoautotrophic (sugar free medium) micropropagation as a new propagation and transplant production system*. Dordrecht Springer, 315p.
- Kozai, T., Iwanami, Y. (1988) Effects of CO₂ enrichment and sucrose concentration under high photon fluxes on plantlet growth of Carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) in tissue culture during the preparation stage. *Journal of the Japanese Society Horticultural Science*, 57:279–288.
- Kozai, T., Koyama, Y., Watanabe, I. (1988) Multiplication and rooting of potato plantlets *in vitro* with sugar medium under high photosynthetic photon flux. *Acta Horticulturae*, 230:121–127.
- Kozai, T., Kubota, C. (2001) Developing a photoautotrophic micropropagation system for woody plants. *Journal of Plant Research*, 114:525–537.
- Kozai, T., Nguyen, Q. T. (2003) *Photoautotrophic micropropagation of Wood and tropical plants. Micropopagation of Wood trees and fruits*. Kluwer Academic Publishers. 757-781.
- Kozai, T., Kubota, C., Byoung, R.J. (1997) Environmental control for the large scale production of plants through *in vitro* techniques. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, 51:49-56.
- Lantos, C., Juhász, A.G., Somogyi, G., Otvos, K., (2009) Improvement of isolated microspore culture of pepper (*Capsicum annuum* L.) via co-culture with ovary tissues of pepper or wheat. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 97:285-293.
- Lee, N., Wezstein, N.H.Y., Sommer, H.E. (1995) Effects of quantum flux density on photosynthesis and chloroplast ultrastructure in tissue-cultured plantlets and seedlings of Liquidambar styraciflua L. towards improved acclimatization and field survival. *Plant Physiology*, 78:637-641.
- Leite, D.L., Anthonisen, D., Barbieri, R.L. (2008) *Caracterização da variabilidade genética de populações locais de pimenta dedo-de-moça, utilizando marcadores RAPD*. Embrapa Clima Temperado. 21p.
- Leite, G.B., Finardi, N., Fortes, G.R. (2000) Efeitos de concentrações de sacarose no meio de cultura e da intensidade luminosa no enraizamento “*in vitro*” do

- porta-enxerto de pereira OH X F97. *Ciência e Ag rotécologia*, Lavras, 24 (2):353-357.
- Liao, F., Wang, B., Zhang, M., Xu, F., Lian, F. (2007) Response to sucrose free culture and diffusive ventilation of plantlets *in vitro* of *Gerbera jamesonii* and photoautotrophic growth potential. *Acta Horticulturae*, 764:257–264.
- Lim, H.T., Lian, Y.J. (2001) Factors influencing protoplast isolation and culture in three *Capsicum* species. *Korean Journal of Plant Tissue Culture*, 28:141-146.
- Loyola-Vargas VM, Vázquez-Flota F (2006). (eds) *Plant cell culture protocols*. Second edn. Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, 318:51-58.
- Lucchesini, M., Mensuali-Sodi, A., Massai, R., Gucci, R. (2006) Development of autotrophy and tolerance to acclimatization of *Myrtus communis* transplants cultured *in vitro* under different aeration. *Biology Plantarum*, 44:167–174.
- Luitel, B.P., Kang, W.H. (2013) Assessment of fruit quality variation in doubled haploids of minipaprika (*Capsicum annuum* L.). *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 54(3), 257–265.
- Lysak, M.A., Dolezel, J. (1998) Estimation of nuclear DNA content in *Sesleria* (Poaceae). *Caryologia*, 51:123-132.
- Macedo, A.F., Costa, M.V.L., Tavares, E.S., Lage, C.L.S., Esquibel, M.A. (2011) The effect of light quality on leaf production and development of *in vitro*-cultured plants of *Alternanthera brasiliana* Kuntze. *Environmental and Experimental Botany*, 70:43–50.
- Macedo, A. (2015) Pimentas *Capsicum*: Uma história de sucesso na cadeia produtiva de hortaliças. In: Hortaliças em revista. Embrapa: Brasília, 18:11p.
- Machado, C.F., Jesus, F.N., Ledo, C.A.S. (2015) Divergência genética de acessos de maracujá utilizando descritores quantitativos e qualitativos. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 37 (2):442-449.
- Magalhães Junior, A. M. M., Peters, J. A. (1991) Cultura “*in vitro*” de ameixeira: Efeito do ácido indolbutírico, tipo de lâmpada e intensidade lumi nosa no enraizamento. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, Campinas, 3 (1):57-61.

- Maguire, J.D., (1962) Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Science*, 2(1):176-177.
- Maluf, W.R. (2001) Heterose e emprego de híbridos F₁ em hortaliças. In: NASS, L.L., Valosis, A.C.C., Melo, I.S., Valadares, M.C. (ed) *Recursos genéticos e melhoramento: plantas*. Rondonópolis, Fundação MT. 650-671p.
- Mantel, N. (1967) The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, 27:209–220.
- Manzur, J.P., Calvache-Asensio, M.D.N., Rodriguez-Burruezo, A. (2014a) Growth regulators and darkness increase efficiency in *in vitro* culture of immature embryos from peppers, *Scientia Agricola*, 71(6):488–493.
- Manzur, J.P., Fita, A., Prohens, J., Rodríguez-Burruezo, A. (2015) Successful Wide Hybridization and Introgression Breeding in a Diverse Set of Common Peppers (*Capsicum annuum*) Using Different Cultivated Ají (*C. baccatum*) Accessions as Donor Parents, *Plos One*, 10(12):1–18.
- Manzur, J.P., Oliva-Alarcón, M., Rodríguez-Burruezo, A. (2014b) *In vitro* germination of immature embryos for accelerating generation advancement in peppers (*Capsicum annuum* L.). *Scientia Horticulturae*, 170:203–210.
- Manzur, J.P., Penella, C., Rodríguez-Burruezo, A. (2013) Effect of the genotype, developmental stage and medium composition on the *in vitro* culture efficiency of immature zygotic embryos from genus *Capsicum*. *Scientia Horticulturae*, 161:181–187.
- Maraschin, S.D.F., De Priester, W., Spaink, H.P., Wang, M. (2005) Androgenic switch: an example of plant embryogenesis from the male gametophyte perspective. *Journal of Experimental Botany*, 56:1711-1726.
- Marks, T.R., Simpson, S.E. (1999) Effect of irradiance on shoot development *in vitro*. *Plant Growth and Regulation*, 28(2):133-142.
- Martins, K.C., Pereira, T.N.S., Souza, S.A.M., Rodrigues, R., do Amaral Junior, A.T. (2015) Crossability and evaluation of incompatibility barriers in crosses between *Capsicum* species. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 15:139-145.

- Martins, K.C. (2014) *Cruzabilidade, tamanho do genoma e viabilidade polínica em Capsicum spp.* Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas), Campos dos Goytacazes, RJ, Universidade do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 122p.
- Melo, L.F., Gomes, R.L.F., Silva, V.B., Monteiro, E.R., Lopes, A.C.A., Peron, A.P. (2014) Potencial ornamental de acessos de pimenta. *Ciência Rural*, 44 (11):2010-2015.
- Milach, S.C.K. (2007) O melhoramento de milho. *Informativo Pioneer*, Santa Cruz do Sul, 25, p. 16-17.
- Minamiyama, Y., Tsuru, M., Hirai, M., (2006) An SSR-based linkage map of *Capsicum annuum*. *Molecular Breeding*, 18(2):157-169.
- Miranda, J.E.C., Casali, V.W.D. (1988) Métodos de melhoramento aplicados as espécies autógamas. Simpósio Brasileiro sobre *Capsicum*. Anais. 15-30p.
- Mohamed, M.A.H., Alsadon, A.A. (2011) Effect of vessel type and growth regulators on micropropagation of *Capsicum annuum*. *Biologia Plantarum*, 55:370-374.
- Mohammad, S.A., Prasanna, B.M. (2003) Analysis of genetic diversity in crop plants- Salient statistical tools and considerations. *Crop Science*, Madison, 43:1235-1248.
- Monteiro, C.E., Da S., Pereira, T.N.S., Campos, K.P. de. (2011) Reproductive characterization of interspecific hybrids among *Capsicum* species. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 11:241–249.
- Moreira, G.R., Caliman F. R. B., Silva D. J. H., Ribeiro C. S. C. (2006) Espécies e variedades de pimenta. *Informe Agropecuário*, 27:16-29.
- Morini, S., Melai, M. (2003) CO₂ dynamics and growth in photoautotrophic and photomixotrophic apple cultures. *Biologia Plantarum*, 47:167-172.
- Moscone, E.A., Scaldaferrro, M.A., Grabiele, M., Cecchini, N.M., García, Y.S., Jarret, R., Daviña, J.R., Ducasse, D.A., Barboza, G.E., Ehrendorfer, F. (2007) The evolution of chili peppers (*Capsicum* – Solanaceae): a Cytogenetic Perspective. *Acta Horticulturae*, 745:137-169.

- Moulin, M.M., Rodrigues, R., Ramos, H.C.C., Bento, C.S., Sudre, C.P., Goncalves, L.S.A., Viana, A.P. (2015) Construction of an integrated genetic map for *Capsicum baccatum* L.. *Genetics and Molecular Research*, 14:6683-6694.
- Moura, M.C.C.L., Gonçalves, L.S.A., Sudré, C.P., Rodrigues, R. (2010) Algoritmo de Gower na estimativa da divergência genética em germoplasma de pimenta. *Horticultura Brasileira*, 28:155-161.
- Murashige, T., Skoog, F.A. (1962) Revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15 (3):473–497.
- Nascimento, N.F.F. (2011), *Combining ability in block size, production and precocity in ornamental pepper plants (Capsicum annuum)*, Universidade Federal da Paraíba.
- Nascimento, M.F., Nascimento, N.F.F., Rêgo, E.R., Bruckner, C.H., Finger, F.L., Rêgo, M.M. (2015) Genetic Diversity in a Structured Family of Six Generations of Ornamental Chili Peppers (*Capsicum Annuum*). *Acta Horticulturae*, 1087:395–401.
- Nascimento, N.F.F., Nascimento, M.F., Santos, R.M.C., Bruckner, C.H., Finger, F.L., Rêgo, E.R., Rêgo, M.M. (2013) Flower color variability in double and three-way hybrids of ornamental peppers. *Acta horticulturae*, 1000:457-464.
- Nascimento, N.F.F., Rêgo, E.R., Rêgo, M.M., Nascimento, M.F., Alves, L.I.F. (2012) Compatibilidade em cruzamentos intra e interespecíficos em pimenteiras ornamentais. *Revista Brasileira de Horticultura Ornamental*. 18:58-62.
- Nascimento, W.M., Dias, D.C.F.S., Freitas, R.A. (2006) Produção de sementes de pimentas. *Informe Agropecuário: cultivo da pimenta*, 27 (235):30 – 39.
- Neitzke, R.S., Fischer, S.Z., Vasconcelos, C.S., Barbieri, R.L., de Oliveira Treptow, R. (2016) Pimentas ornamentais: aceitação e preferências do público consumidor. *Horticultura Brasileira*, 34(1):102-109.
- Neitzke, R.S., Barbieri, R.L., Heiden, G., Castro, C.M. (2008) Divergência genética entre variedades locais de *Capsicum baccatum* utilizando caracteres multicategóricos. *Magistra*, 20:249-255.

- Neitzke, R.S., Barbieri, R.L., Rodrigues, W.F., Correa, I.V., Carvalho, F.I.F. (2010) Dissimilaridade genética entre acessos de pimenta com potencial ornamental. *Horticultura Brasileira*, 28:47-53.
- Nguyen, Q.T., Kozai, T. (2005) Photoautotrophic micropropagation of woody species. In: Kozai, T., Afreen, F., Zobayed, S.M.A. (eds) *Photoautotrophic (sugar-free medium) micropropagation as a new micropropagation and transplant production system*. Dodrecht: Springer, 123–146.
- Nitsch, J.P., Nitsch, C. (1969) Haploid plants from pollen grains. *Science*, 163:85–87
- Noè, N., Eccher, T., Bonini, L. (1997) Effect of irradiance and spectral composition of radiation on *in vitro* shoot proliferation in *Malus domestica* Borkh. *Biologia Plantarum*, 39:491-497.
- Nowaczyk, P., Kisiala, A. (2006) Effect of selected factors on the effectiveness of *Capsicum annuum* L. anther culture. *Journal of Applied Genetics*, 47:113-117.
- Nowaczyk, P., Olszewska, D., Kisiala, A. (2009) Individual reaction of *Capsicum* F₂ hybrid genotypes in anther cultures. *Euphytica*, 168:225–233.
- Nuez, F., Gil Ortega, R., Costa, J. (1996) *El Cultivo de Pimientos, chiles y ajies*. Madri: Ediciones Mundi-Prensa, 607p.
- O'brien, T.P., Feder, N., Mccully, M.E. (1964) Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma*, 59 (2):368-373.
- Ochoa-Alejo, N., Ramirez-Malagon, R. (2001) *In vitro* chili pepper biotechnology. *In vitro Cellular Developmental Biology-Plant*, 37 (6):701-729.
- Ohara, R., Pinto, C. M. F. (2012) Mercado de pimentas processadas. *Informe Agropecuário*, 33 (267):7-13.
- Olszewska, D., Jedrzejczyk, I., Nowaczyk, P., Sendel, S., e Gaczowska, B. (2015) *In vitro* colchicine treatment of anther-derived pepper haploids. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 21 (4):806–810.
- Panorama Rural. (2006) Pimenta - um mundo de cores e sabores. *Panorama Rural*, 84:30-35.

- Park, S.W., Jeon, J.H., Kim, S.H., Park, Y.M., Aswath, C., Joung, H. (2004) Effect of sealed and vented gaseous microenvironment on hyperhydricity of potato shoots *in vitro*. *Scientia Horticulturae*, 99:199-205.
- Park, S.Y., Moon, H.K., Murthy, H.N., Kim, Y.W. (2011) Improved growth and acclimatization of somatic embryo-derived *Oplopanax elatus* plantlets by ventilated photoautotrophic culture. *Biologia Plantarum*, 55:559–562.
- Pasqual, M. (2001) *Cultura de tecidos - introdução: fundamentos básicos*. Lavras: UFLA/FAEPE. (Curso de pós-graduação “Lato sensu” a distância: Cultura de tecidos Vegetais: Tecnologias e Aplicações). 197 p.
- Peakall, R., Smouse, P.E. (2012) *GenAlEx 6.5*: genetic analysis in Excel, Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics*, 28(19):2537–2539.
- Pearse, A.G.E. (1980) *Histochemistry theoretical and applied*. Longman Group, 4. ed. 2.
- Pessoa, A.M. dos S., Rêgo, E.R., Barroso, P.A., Rêgo, M.M. (2015) Genetic Diversity and Importance of Morpho-Agronomic Traits in a Segregating F₂ Population of Ornamental Pepper. *Acta Horticulturae*, 1087:195–200.
- Peters, J.A., Bobrowski, V.L., Rosinha, G.M.S. (1999) Produção de produção e duplo haplóides. In: Torres, A.C., Caldas, L.S., Buso, J.A. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: EMBRAPA-SPI, EMBRAPA-CNPq. p. 569-611.
- Pickersgill, B. (1971) Relationships between weedy and cultivated forms in some species of chili peppers (genus *Capsicum*). *Evolution*, 25:683–691.
- Pickersgill, B. (1991) Cytogenetics and evolution of *Capsicum* L, In: Tsuchiya, T., Gupta, P.K. (eds.) *Chromosome engineering in plants: genetics, breeding, evolution*. part B. Amsterdam: Elsevier, p. 139-160.
- Pickersgill, B. (1997) Genetic resources and breeding of *Capsicum* spp. *Euphytica*, 96(1):129–133.
- Pickersgill, B. (2007) Domestication of plants in the Americas: insights from mendelian and molecular genetics. *Annals of Botany*, 100:925-940.

- Pierre, P.M.O., Davide, L.M.C., Couto, E.G.D.O., Silva, T.N., Ramalho, M.A.P., Santos, J.B. Dos. (2011) Doubled haploids: importance in the genetic breeding of maize. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, 10(1):1-16.
- Pinheiro, M. V. M., Martins, F. B., Xavier, A., Otoni, W. C. (2013) Trocas gasosas influenciam na morfogênese *in vitro* de duas cultivares de oliveira (*Olea europaea* L.). *Revista Árvore*, Viçosa – MG, 37 (1):19-29.
- Pinto, C. M. F., Barbosa, J. M., Mesquita, D. Z., Oliveira, F. D., Mapeli, A. M., Segatto, F. B., Barbosa, J. G. (2010) Produção e qualidade de pimentas ornamentais comestíveis cultivadas em recipientes de diferentes volumes. *Revista brasileira de horticultura ornamental*, 16 (1):113-122.
- Pinto, C.M.F., Pinto, C.L.O., Finger, F.L., Ribeiro, W.S. (2012) Pimentas Ornamentais Comestíveis: uma oportunidade para o agronegócio familiar. In: *Simpósio Brasileiro de Agropecuária Sustentável*. Anais. Viçosa: UFV, 4: p. 138-157.
- Pospisilova, J., Solarova, J., Catsky, J., Ondrej, M., Opatrny, Z. (1988) The photosynthetic characteristics during the micropropagation of tobacco and potato plants. *Photosynthetica*, 22:205-213.
- Prakash, A.H., Rao, K.S., Kumar, M.U. (1997) Plant regeneration from protoplasts of *Capsicum annuum* L. cv. California Wonder. *Journal of Biosciences*, 22:339-44.
- Prestes, A.M., Goulart, L.R. (1995) Transferência de resistência a doenças de espécies silvestres para espécies cultivadas. *RAPP*, 3:315-363.
- Pritchard, J.K., Stephens, M., Donnelly, P. (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155:945-959.
- Pyke, K., López-Juez, E. (1999) Cellular differentiation and leaf morphogenesis in *Arabidopsis*. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 18 (4):527-546.
- Quintal, S.S.R., Viana, A.P., Gonçalves, L.S.A., Pereira, M.G., Amaral Junior, A.T. (2012) Divergência genética entre acessos de mamoeiro por meio de variáveis morfoagronômicas. *Ciências Agrárias*, 33 (1):131-142.

- Radmann, E. B., Braga, E. J. B., Karan, M. A. L., Posada, M. A. C., Peters, J. A. (2001) Influência da densidade de fluxo luminoso na qualidade de plantas micropropagadas de *Gypsophila paniculata* L. *Revista Brasileira de Agrociência*, 7 (3):171-175.
- Radochova, B., Vicankova, A., Kutik, J., Ticha, I. (2000) Leaf structure of tabaco *in vitro* grown plantlets as affected by saccharose and irradiance. *Biologia Plantarum*, 43 (4):633-636.
- Rappaport, J. (1954) *In vitro* culture of plant embryos and factors controlling their growth. *The Botanical Review*, 20 (4):201–225.
- Rasai, S., Kantharajah, A.S., Dodd, W.A. (1994) The effect of growth-regulators, source of explants and irradiance on *in vitro* regeneration of atemoya. *Australian Journal of Botany*, 42 (3):333-340.
- Rêgo, E.R., Finger, F.L., Nascimento, M.F., Barbosa, L.A.B., Santos R.M.C. (2011a) Pimenteiras Ornamentais. In: Rêgo, E.R. Finger, F.L. Rêgo, M.M. (Org.). *Produção, Genética e Melhoramento de Pimentas (Capsicum spp.)*. 1 ed. Recife - PE: Imprima, 1: p. 117-136.
- Rêgo, E.R., Rêgo, M.M., Cruz, C.D., Finger, F.L., Casali, V.W.D. (2011b) Phenotypic diversity, correlation and importance of variables for fruit quality and yield traits in Brazilian peppers (*Capsicum baccatum*). *Genetic Resources and Crop Evolution*, 58 (6):909-918.
- Rêgo, E.R., Rêgo, M.M., Cruz, C.D., Cecon, P.R., Amaral, D.S.S.L., Finger, F.L. (2003) Genetic diversity analysis of peppers: a comparison of discarding variable methods. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 3(1):19–26.
- Rêgo, E.R., Finger, F.L., Rêgo, M.M. (2012a) Consumption of pepper in Brazil and its implications on nutrition and health of humans and animals. In: *Peppers: Nutrition, Consumption and Health* (Salazar MA and Ortega JM, eds.). Nova Science Publishers, 159-170.
- Rêgo, E.R., Finger, F.L., Rêgo, M.M. (2012b) Types, uses and fruit quality of Brazilian chili peppers. In: *Spices: Types, Uses and Health Benefits* (Kralis JF, ed.). Nova Science Publishers, p. 131-144.

- Rêgo, E.R., Rêgo, M.M., Finger, F.L., Cruz, C.D., Casali, V.W.D. (2009) A diallel study of yield components and fruit quality in chilli pepper (*Capsicum baccatum*). *Euphytica*, 168:275-287.
- Rêgo, E.R., Rêgo, M.M., Finger, F.L., Nascimento, N.F.F., Nascimento, M.F., Santos, R.M.C. (2013) Brazilian ornamental pepper breeding program: a consortium among universities, small farmers and government agencies, In: *Meeting on genetics and breeding of capsicum and eggplant eucarpia*. XV. 431-434.
- Rêgo, M.M., Sapucay, M.J.L.C., Rêgo, E.R., Araújo, E.R. (2015) Analysis of Divergence and Correlation of Quantitative Traits in Ornamental Pepper (*Capsicum* spp.). *Acta Horticulturae*, 1087:389–394.
- Reifschneider, F.J.B., Ribeiro, C.S.C. (2008) *Cultivo de Pimentas Capsicum*. Athalaya, p. 11-14.
- Reynolds, T.L. (1997) Pollen embryogenesis. *Plant Molecular Biology*, 33:1-10.
- Ribeiro, A.P.O., Picoli, E.A.T., Lani, E.R.G., Vendrame, W.A., Otoni, W.C. (2009) The influence of flask sealing on *in vitro* morphogenesis of eggplant (*Solanum melongena* L.). *In vitro Cellular and Development Developmental Biology*, 45 (4):421-428.
- Ribeiro, C.S. da, Cruz, D.M.R. (2002). Tendências de mercado. Disponível em:<http://www.grupocultivar.com.br/site/content/artigos/artigos.php?id=406>. Acesso: Janeiro de 2019.
- Ribeiro, C.S.C., Reifschneider, F.J.B. (2008) *Cultivo de Pimentas Capsicum*. Brasília: Athalaya, p. 11-14.
- Ribeiro, W.S. (2012) Avaliação de substratos e poda na produção de pimenteira ornamental. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Curso de Pós-graduação em Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa. MG. 92p.
- Rick, C.M., Chetelat, R.T. (1995) Utilization of related wild species for tomato improvement. *Acta Horticulturae*, 412:21–38.

- Riva, E.M., Rodrigues, R., Sudré, C.P., Pereira, M.G., Viana, A.P., Amaral Júnior, A.T. (2007) Obtaining pepper F_{2:3} lines with resistance to the bacterial spot using the pedigree method. *Horticultura Brasileira*, 25:567-571.
- Rocha, M., Licausi, F., Araujo, W., Nunes-Nesi, A., Sodek, L., Fernie, A.R, Van Dongen, J.T. (2010) Glycolysis and the tricarboxylic acid cycle are linked by alanine amino transferase during hypoxia induced by water logging of *Lotus japonicus*. *Plant Physiol*, 152:1501–1513.
- Rodeva, V., Irikova, T., Todorova, V. (2004) Anther culture of pepper (*Capsicum annuum* L.): comparative study on effect of the genotype. *Biotechnol. Biotechnol*, 3:34-38.
- Rodrigues, M., Costa, T.H.F, Festucci-Buselli, R.A., Silva, L.C., Otoni, W.C. (2011) Effects of flask sealing and growth regulators on *in vitro* propagation of neem (*Azadirachta indica* A. Juss.). *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 48 (1):1-6.
- Rodrigues, R., Sudré, C.P., Cento, C.S, Pimenta, S., Medeiros, A. M., Moulin, M.M., Gonçalves, L.S.A., Cunha, M., Neves, L.G., Gomes, V.M. (2014) *Capsicum Working Group: a Collaborative Multidisciplinary Effort to improve Sweet and Chili Pepper* - 10. The 22nd International Pepper Conference 2014. Vinã Del Mar, Chile. 137p.
- Rufino, J.L.S., Penteado, D.C.S. (2006) Importância econômica, perspectivas e potencialidades do mercado para pimenta. *Informe Agropecuário*, 2 (235):7-15.
- Saldanha, C.W., Otoni, C.G., Azevedo, J.L.F., Dias, L.L.C., do Rêgo, M.M., Otoni, W.C. (2012) A low-cost alternative membrane system that promotes growth in nodal cultures of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 110(3):413–422.
- Sanatombi, K., Sharma, G.J. (2008) *In vitro* plant regeneration in six cultivars of *Capsicum* spp. using different explant. *Biologia Plantarum*, 52:141-145.
- Santana, J.R.F. de, Paiva, R., Pereira F.D., Oliveira, L.M. de. (2008) Estímulo do comportamento fotoautotrófico durante o enraizamento *in vitro* de *Annona glabra* L. *Ciência Agrotecnologia*, 32 (1):80-86.

- Santana-Buzzy, N., Canto-Flick, A., Barahona-Pérez, F., Montalvo-Peniche, Mc., Zapata-Castillo, Py., Solís-Ruiz, A. (2005) Regeneration of Habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) via organogenesis. *Horticultural Science*, 40:1829-1831.
- Sass, J.E., (1940) *Elements of Botanical Microtechnique*. McGraw. Hill Book Company Inc., New York. 241p.
- Seguí-Simarro, J.M. (2010) Androgenesis revisited. *The Botanical Review*, 76:377-404.
- Seguí-Simarro, J.M., Corral-Martínez, P., Parra-Veja, V., González-García, B. (2011) Androgenesis in recalcitrant solanaceous crops. *Plant Cell Reports*, 30:765-778.
- Sibi, M., Dumas de Vaulx, R., Chambonnet, D. (1979) Obtention de plantes haploides par andogenese *in vitro* chez Le piment (*Capsicum annum* L.). Ann. Amélior. *Plant*, 29:583-606.
- Silva, A.B., Pasqual, M., Castro, E.M., Miyata, L.Y., Melo, L.A, Braga, F.T. (2008) Luz natural na micropropagação do abacaxizeiro. *Interciencia*, 33 (11):839-843.
- Silva, C.Q., Jasmim, J.M., Santos, J.O., Bento, C.S., Sudré, C.P., Rodrigues, R. (2015) Phenotyping and selecting parents for ornamental purposes in pepper accessions. *Horticultura Brasileira*, 33:66–73.
- Silva, C.Q., Rodrigues, R., Bento, C.S., Pimenta, S. (2017) Heterosis and combining ability for ornamental chili pepper. *Horticultura Brasileira*, 35 (3):349–357.
- Silva, C.Q. da. (2015) *Heterose e capacidade combinatória de híbridos de Capsicum annum para o mercado ornamental*. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas), Campos dos Goytacazes, RJ, Universidade do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 70p.
- Silva, D.J.H. (2004) Pesquisa com *Capsicum* sp. nas universidades brasileiras. I Encontro Nacional do Agronegócio Pimenta (*Capsicum* spp.)
- Silva, A. R. da, Cecon, P. R., do Rêgo, E. R., Nascimento, M. (2011). Avaliação do coeficiente de variação experimental para caracteres de frutos de pimenteiras. *Ceres*, 58 (2):168-171.

- Skrebsky, E.C., Nicoloso, F.T., Ferrão, G.E. (2004) Sacarose e período de cultivo *in vitro* na aclimação ex vitro de ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata* Spreng. Pedersen). *Ciência Rural*, 34:1471-1477.
- Smith, M.A.L., Spomer, L.A. (1995) *Vessels, gels, liquid media, and support systems. Automation and environmental control in plant tissue culture*. Kluwer, Dordrecht, p. 371– 404.
- Sokal, R.R., Rohlf, F.J. (1962) The comparison of dendrograms by objective methods. *Taxon*, 11:30-40.
- Srivastava, S., Srivastava, A.K. (2008) In Vitro Azadirachtin Production. In: Ramawat, K.G., Merillon, J.M. (eds). *Bioactive molecules and medicinal plants*. Berlin: Springer. 233-254.
- Stommel, J.R., Bosland, P.W. (2005) Pepper Ornamental. *Capsicum annuum*. In N.O., Anderson (ed.). *Flower breeding and genetics: Issues, challenge and opportunities for the 21st century*. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers. p. 561-599.
- Sudré, C.P., Gonçalves, L.S.A., Rodrigues, R., Amaral Júnior, A.T., Riva-Souza, E.M., Bento, C.S. (2010) Genetic variability in domesticated *Capsicum* spp as assessed by morphological and agronomic data in mixed statistical analysis. *Genetics and Molecular Research*, 9 (1):283-294.
- Sudré, C.P., Cruz, C.D., Rodrigues, R., Riva, E.M., Amaral Junior, A.T., Silva, D.J.H., Pereira, T.N. (2006) Variáveis multicategóricas na determinação da divergência genética entre acessos de pimenta e pimentão. *Horticultura Brasileira*, 24:88-93.
- Supena, E.D., Suharsono, S., Jacobsen, E., Custers, J.B. (2006) Successful development of a shed-microspore culture protocol for doubled haploid production in Indonesian hot pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Cell Reports*, 25:1–10.
- Suzuki T., Iwai K. (1984) Constituents of red pepper species: chemistry, biochemistry, pharmacology, and food science of the pungent principle of

- Capsicum* species. In: The alkaloids: Chemistry and pharmacology Bross, A., Ed. Academic Press: Orlando, FL, 23:Chapter 4.
- Taiz, L., Zeiger, E. (2013) Fisiologia Vegetal. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 820p.
- Tanaka, Y., Sano, T., Tamaoki, M., Nakajima, N., Kondo, N., Hasezawa, S. (2005) Ethylene inhibits abscisic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 138:2337-2343.
- Tanksley, S.D. (1984) High rates of cross-pollination in chile pepper. *HortScience*, 19 (4):580-582.
- Tisserat, B., Vaughn, S.F., Sillman, R. (2002) Influence of modified oxygen and carbon dioxide atmospheres on mint and thyme plant growth, morphogenesis and secondary metabolism *in vitro*. *Plant Cell Reports*, 20: 912-916.
- Tisserat, B., Berhow, M., Vaughn, S.F. (2009) Spearmint plantlet culture system as a means to study secondary metabolism. In: JAIN, S.M., SAXENA, P.K. (eds). *Protocols for in vitro cultures and secondary metabolite analysis of aromatic and medicinal plants*. New York: Humana Press. p. 313-324.
- Tong, N., Bosland, P.W. (1999) *Capsicum tovarii*, a new member of the *Capsicum baccatum* complex. *Euphytica*, 109 (2):71–77.
- Torres Netto, A., Campostrini, E., Oliveira, J.G., Yamanishi, O.K. (2002) Portable chlorophyll meter for the quantification of photosynthetic pigments, nitrogen and the possible use for assessment of the photochemical process in *Carica papaya* L. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 14 (3): 203-210.
- Torres, A.C., Caldas, L.S., Buso, J.A. (1999) Cultura de tecidos e transformação genética de plantas, 2. 1. ed. Brasília: Embrapa SPI/ Embrapa-CNPH. 355p.
- Vencovsky, R. (1978) Herança quantitativa. In: Melhoramento e produção do milho no Brasil (Paterniani E, ed.). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, p. 122-201.
- Vencovsky, R., Barriga, P. (1992) Genética biométrica no fitomelhoramento. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto. 486p.

- Vinterhalter, B., Vinterhalter, D., Nešković, M. (2001) Effect of irradiance, sugars and nitrogen on leaf size of *in vitro* grown *Ceratonia siliqua* L. *Biologia Plantarum*, 44:185-188.
- Wagner, C.M. (2003) *Variabilidade e base genética da pungência e de caracteres do fruto, Implicações no melhoramento de uma população de Capsicum annuum* L. Piracicaba. Tese (Doutorado). 184p.
- Walter, R., Carvalho, V.S., Generoso, A.L., Rodrigues, R., Gravina, G.A. (2018) Cultivation of immature *Capsicum* spp. embryos for incompatible-crossing embryo rescue. *Acta Scientiarum*, 40 (1):1-8.
- Walter, R., Carvalho, V.S., Generoso, A.L., Campbell, G., Cunha, M. da, Rodrigues, R. (2019) Overcoming post-zygotic hybridization barriers in *Capsicum annuum* var. *annuum*. *Scientia Horticulturae*, 246:227–236.
- Walter, R. (2015) *Resgate de embriões zigóticos de espécies do gênero Capsicum visando à sua utilização em programas de melhoramento genético*. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas), Campos dos Goytacazes, RJ, Universidade do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 55p.
- Wang, M., Van Bergen, S., Van Duijn, B. (2000) Insights into a key developmental switch and its importance for efficient plant breeding. *Plant Physiology*, 124: 523-530.
- Wang, Y.Y., Sun, C.S., Wang, C.C., Chien, N.J. (1973) The induction of pollen plantlets of Triticale and *Capsicum annuum* anther culture. *Scientia Sinica*, 16:147–151.
- Wijbrandi, J., De Both, M.T.J., (1993) Temperate vegetable crops. *Scientia Horticulturae*, 55:37-63.
- Xiao, Y., Niu, G., Kozai, T. (2011) Development and application of photoautotrophic micropropagation plant system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 105:149-158.
- Yoon, Y.J., Mobin, M., Hahn, E.J., Paek, K.Y. (2009) Impact of *in vitro* CO₂ enrichment and sugar deprivation on acclamatory responses of *Phalaenopsis*

plantlets to *ex vitro* conditions. *Environmental and Experimental Botany*, 65:183-188.

- Yoon, J.B., Yang, D.C., Do, J.W., Park, H.G. (2006) Overcoming two post-fertilization genetic barriers in interspecific hybridization between *Capsicum annuum* and *C. baccatum* for introgression of anthracnose resistance. *Breeding Science*, 56 (1):31–38.
- Zeeman, S.C., Kossmann, J., Smith, A.M. (2010) Starch: Its metabolism, evolution and biotechnological modification in plants. *Annual Review Plant Biology*, 61:209 – 234.
- Zeni, A.L., Bosio, F. (2011) O uso de plantas medicinais em uma comunidade rural de Mata Atlântica – Nova Rússia. SC. *Neotropical Biology and Conservation*, 6 (1):55-63.
- Zhang, M., Zhao, D., Ma, Z., Li, X., Xiao, Y. (2009) Growth and photosynthetic capability of *Momordica grosvenori* plantlets grown photoautotrophically in response to light intensity. *Horticultural Science*, 44:757-763.
- Zhang, Q., Hu, J., Sheng, L., Li, Y. (2010) Simultaneous quantification of capsaicin and dihydrocapsaicin in rat plasma using HPLC coupled with tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 878:2292–2297.
- Zijlstra, S., Purimahua, C., Lindhout, P. (1991) Pollen tube growth in interespecific crosses between *Capsicum* species. *HortScience*, 26:585-586.
- Zobayed, S.M.A. (2006) Aeration in plant tissue culture. In: Dutta Gupta, S., Ibaraki, Y. (eds) *Plant tissue culture engineering*. Dodrecht: Springer, p. 313–327.